

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

(21) PI 0808222-7 A2



(22) Data de Depósito: 10/04/2008
(43) Data da Publicação: 08/07/2014
(RPI 2270)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/82
A01H 5/00
A01H 5/10
C12P 7/64
C12N 9/02

(54) Título: "POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, CÉLULA VEGETAL, MÉTODO PARA PRODUIR UMA PLANTA TRANSFORMADA, PARA FABRICAR ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, PARA PRODUIR PELO MENOS UM ÁCIDO GRAXOS POLI-INSATURADOS EM UMA CÉLULA VEGETAL OLEAGINOSA, PARA PRODUIR ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, EMENTES TRANSGÊNICAS, ÓLEOS OU SUBPRODUTOS, PLANTAS OLEAGINOSAS, PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, SEMENTES TRANSGÊNICAS, ÓLEO, ALIMENTOS OU ALIMENTAÇÕES E PLANTAS DAS PROGÊNIES

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 10/04/2007 US 60/910,831

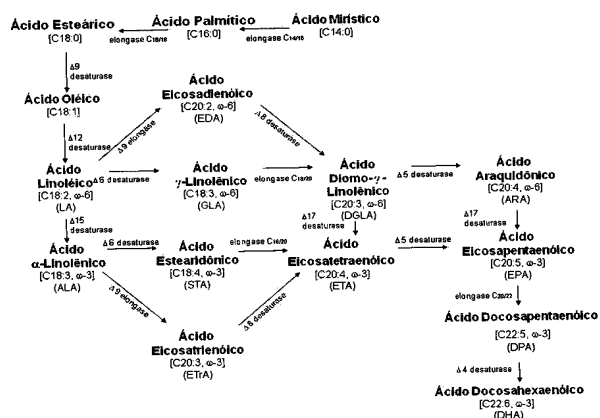
(73) Titular(es): E I Du Pont De Nemours And Company

(72) Inventor(es): HOWARD G. DAMUDE, Quinn Qun Zhu

(74) Procurador(es): Priscila Penha de Barros Thereza

(86) Pedido Internacional: PCT US2008059844 de 10/04/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/124806 de 16/10/2008



“POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA
 RECOMBINANTE, CÉLULA VEGETAL, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA
 PLANTA TRANSFORMADA, PARA FABRICAR ÁCIDOS GRAXOS POLI-
 INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, PARA
 5 PRODUZIR PELO MENOS UM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO EM UMA
 CÉLULA VEGETAL OLEAGINOSA, PARA PRODUZIR ÁCIDOS GRAXOS
 POLI-INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL,
 SEMENTES TRANSGÊNICAS, ÓLEOS OU SUBPRODUTOS, PLANTAS
 OLEAGINOSAS, PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, SEMENTES
 10 TRANSGÊNICAS, ÓLEO, ALIMENTOS OU ALIMENTAÇÕES E PLANTAS
 DAS PROGÊNIES”

Este pedido reivindica prioridade ao pedido provisório de patente
 US 60/910831, depositado em 10 de abril de 2007, cujo conteúdo é
 incorporado ao presente pedido como referência.

15 CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção é da área de biotecnologia. Mais especificamente,
 esta invenção refere-se às sequências de polinucleotídeos que codificam delta-
 8 desaturases e o uso destas desaturases na fabricação de ácidos graxos poli-
 insaturados de cadeia longa (PUFAs).

20 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A importância dos PUFAs é indiscutível. Por exemplo, certos
 PUFAs são componentes biológicos importantes para a saúde das células e
 são reconhecidos como ácidos graxos “essenciais” que não podem ser
 sintetizados pelos mamíferos e, ao contrário, devem ser obtidos tanto na dieta
 25 como, ainda, derivados do alongamento e desnaturação do ácido linoléico (LA;
 18:2 ω -6) ou ácido α -linolênico (ALA; 18:3 ω -3); são componentes da
 membranas plasmática das células, onde podem ser encontrados na forma de
 fosfolipídeos ou trigliceróis; são necessários para o desenvolvimento

apropriado (particularmente no desenvolvimento do cérebro das crianças) e na formação e reparo dos tecidos; e são precursores para diversos eicosanóides ativos biologicamente, importantes para os mamíferos (por exemplo prostaciclina, eicosanóides, leucotrienos, prostaglandinas). Além disso, uma

5 alta ingestão de PUFA ω -3 produz efeitos protetores cardiovasculares (Dyerberg *et al.*, *Amer. J. Clin. Nutr.* 28:958-966 (1975); Dyerberg *et al.*, *Lancet*. 2(8081):117-119 (1978); Shimokawa, H., *World Rev. Nutr. Diet* 88:100-108 (2001); von Schacky *et al.*, *World Rev. Nutr. Diet* 88:90-99 (2001)). Diversos outros estudos documentam os inúmeros benefícios à saúde conferidos pela

10 administração de PUFA ω -3 e ω -6 contra uma variedade de sintomas e doenças (por exemplo, asma, psoríase, eczema, diabetes e câncer).

Hoje, diversos hospedeiros diferentes incluindo plantas, algas, fungos e leveduras estão sendo investigados como meios para a produção

15 comercial de PUFA através de numerosos esforços diferentes. Embora a capacidade natural dos organismos hospedeiros de produzir PUFA seja algumas vezes essencial para uma dada metodologia, a engenharia genética também provou que as capacidades naturais de alguns hospedeiros (até mesmo aqueles limitados de forma nativa à produção de ácido graxo LA e ALA)

20 podem ser substancialmente alteradas para resultar em uma produção de alto nível de vários PUFA ω -3/ ω -6 de cadeia longa. Se este efeito for resultante das capacidades naturais ou de tecnologia recombinante, toda produção de ácido araquidônico (ARA, 20:4 ω -6), ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω -3) e ácido docosapentanoico (DHA, 22:6 ω -3) exige expressão

25 tanto da via δ -9 elongase/ δ -8 desaturase (que opera em alguns organismos, como espécies euglenóides, e que é caracterizada pela produção de ácido eicosadienoico (EDA, 20:2 ω -6) e/ou ácido eicosatrienoico (ETRA, 20:3 ω -3) como da via δ -6 desaturase/ δ -6 elongase (que é

predominantemente encontradas em algas, musgos, fungos, nematóides e humanos, e que é caracterizada pela produção de ácido γ -linolênico (GLA, 18:3 ω -6) e/ou ácido estearidônico (STA, 18:4 ω -3) (figura 6). A delta-6 elongase também é conhecida como uma elongase C_{18/20}.

5 As enzimas delta-8 desaturases identificadas até agora, têm a capacidade de converter tanto EDA para ácido diomo- γ -linolênico (DGLA; 20:3) como ETA para ácido eicosatetraenóico (ETA; 20:4) (sendo que ARA e EPA são subsequentemente sintetizados a partir de DGLA e ETA, respectivamente, seguindo reação com uma delta-5 desaturase, enquanto a síntese de DHA
10 exige expressão subsequente de uma elongase C_{20/22} adicional e de uma delta-4 desaturase).

Com base no papel das enzimas delta-8 desaturases na síntese de, consideráveis para identificar e caracterizar estas enzimas. Esforços iniciais no isolamento e caracterização de delta-8 desaturases de *Euglena gracilis*; e,
15 diversas variações de sequências na delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* foram relatadas (consulte, por exemplo, Wallis *et al.*, *Arch. Biochem. and Biophys.* 365(2):307-316 (1999), Publicação PCT documento WO 2000/34439, patente US 6.825.017, Publicação PCT documento WO 2004/057001). Também, pedidos co-pendentes do Titular da Depositante tendo Pedidos de
20 Patente US N^{os} 11/166.003 e 11/166.993, depositados em 24 de junho de 2005 (Números de Registros Legais BB-1547 e CL-3150, respectivamente (Publicação PCT documento Os documentos 2006/012325 e WO 2006/012326, ambos publicados em 2 de fevereiro de 2006, divulgam sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos para a enzima delta-8 desaturase de *Euglena*
25 *gracilis*.

Mais recentemente, a Publicação PCT documento WO 2005/103253 (publicado em 22 de abril de 2005) divulga sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos para a enzima delta-8 desaturase de *Pavlova*

- salina* (consulte também Publicação US 2005/0273885). Sayanova *et al.* (*FEBS Lett.* 580:1946-1952 (2006)) descrevem o isolamento e a caracterização de um cDNA de amebas de solo de vida livre *Acanthamoeba castellanii* que quando expressos em *Arabidopsis*, codificam uma C₂₀ delta-8 desaturase.
- 5 Também, o pedido co-pendente do Titular da Depositante tendo Pedido Provisório US Nº 11/737772 (depositado em 20 de abril de 2007; Número de Registro Legal 1566 BB) divulga sequências de aminoácidos e de ácidos nucleicos para uma enzima delta-8 desaturase de *Pavlova lutheri* (CCMP459). O pedido de patente US Nº 11/876115 (depositado em 22 de outubro de 2007;
- 10 Número de Registro Legal 1566 BB) divulga sequências de aminoácidos e de ácidos nucleicos para uma enzima delta-8 desaturase de *Tetruetrepia pomquetensis* CCMP1491, *Eutreptiella* sp. CCMP389 e *Eutreptiella cf. gymnastica* CCMP1594.

- Com base na utilidade da expressão de delta-8 desaturases junto
- 15 com delta-9 elongases, foram realizados esforços consideráveis para identificar e caracterizar delta-9 elongases a partir de várias fontes. Uma delta-9 elongase de *Isochrysis galbana* está publicamente disponível (descrita no GenBank com número de acesso AAL37626, bem como Publicação PCT documento WO 02/077213). O pedido co-pendente do Titular da Depositante
- 20 tendo Pedido Provisório US Nº 11/601.563 (depositado em 16 de novembro de 2006, que publicou em 24 de maio de 2007; Número de Registro Legal BB-1562) divulga uma delta-9 elongase de *Euglena gracilis*.

- O Titular da Depositante tem vários pedidos de patentes relacionados à produção de PUFA's em leveduras oleaginosas (isto é, *Yarrowia*
- 25 *lipolytica*), incluindo: Publicações PCT documentos WO 2004/101757 e WO 2004/101753 (ambos publicados em 25 de novembro de 2004), pedido de patente US 11/265.761 (depositado em 2 de novembro de 2005), pedido de patente US 11/264.784 (depositado em 1 de novembro de 2005), e pedido de

patente US 11/264.737 (depositado em 1 de novembro de 2005).

Da mesma forma, o documento a publicação PCT documento WO 2004/071467 (publicado em 26 de agosto de 2004; Número de Registro Legal BB-1538) refere-se à produção de PUFA's em vegetais, enquanto a publicação
5 PCT documento WO 2004/071178 (publicado em 26 de agosto de 2004) refere-se aos promotores anexina e seus usos na expressão de transgenes em vegetais; ambos são pedidos co-pendentes do Titular da Depositante.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a um polinucleotídeo isolado que
10 compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que o polipeptídeo tem pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácido, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação a uma sequência de aminoácidos
15 conforme apresentada na SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou or SEQ ID NO:24;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que a sequência de nucleotídeos tem pelo menos 80% de identidade de sequência, com base no
20 método de alinhamento BLASTN, em comparação a uma sequência de nucleotídeos conforme apresentada na SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 ou SEQ ID NO:20;

(c) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que a sequência de
25 nucleotídeos, mediante condições estridentes, hibridiza com uma sequência de nucleotídeos conforme apresentada na SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 ou SEQ ID NO:20; ou

(d) um complemento da sequência de nucleotídeo de (a), (b) ou

(c), sendo que o complemento e a sequência de nucleotídeos consistem no mesmo número de nucleotídeos e são 100% complementares.

Em uma segunda realização, a invenção refere-se a um constructo de DNA recombinante que compreende qualquer um dos polinucleotídeos isolados da invenção, ligados de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora.

Em uma terceira realização, a invenção refere-se a uma célula vegetal que compreende um constructo de DNA recombinante da invenção.

Em uma quarta realização, a invenção refere-se a um método para transformação de uma célula vegetal, que compreende transformar uma célula vegetal com um constructo recombinante da invenção ou um polinucleotídeo isolado da invenção e selecionar essas células vegetais transformadas com o constructo recombinante do polinucleotídeo isolado.

Em uma quinta realização, a invenção refere-se às sementes transgênicas que compreendem em seu genoma o constructo recombinante da invenção ou uma semente transgênica obtida a partir de uma planta produzida por um método da invenção. Também é de interesse o óleo ou os subprodutos obtidos a partir das sementes transgênicas.

Em uma sexta realização, a invenção refere-se a um método para fabricação de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa em uma célula vegetal que compreende:

(a) transformar uma célula vegetal com o constructo recombinante da invenção; e

(b) selecionar essas células vegetais transformadas que produzem ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa.

Em uma sétima realização, a invenção relaciona-se a um método para produção de pelo menos um ácido graxo poli-insaturado em uma célula vegetal oleaginosa que compreende:

(a) transformar uma célula vegetal oleaginosa com um primeiro constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica pelo menos um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora e pelo menos um constructo
5 de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em uma delta-4 desaturase, uma delta-5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17
10 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e uma elongase C_{20/22};

(b) regenerar uma planta oleaginosa a partir da célula transformada da etapa (a); e

(c) selecionar essas sementes obtidas a partir das plantas da
15 etapa (b) que têm um nível alterado de ácidos graxos poliinsaturados em comparação ao nível nas sementes obtidas a partir de plantas oleaginosas não transformadas.

Em uma oitava realização, a invenção refere-se a uma planta oleaginosa que compreende em seu genoma o constructo de DNA
20 recombinante da invenção. Exemplos de plantas oleaginosas adequadas incluem, mas não se limitam a, soja, espécies de *Brassica*, girassol, milho, algodão, linho e cártamo.

Em uma nona realização, a invenção refere-se a uma planta oleaginosa que compreende:

25 (a) um primeiro constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica pelo menos um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e

(b) pelo menos um constructo de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em uma delta-4 desaturase, uma delta-5
5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e uma elongase C_{20/22}.

São também de interesse as sementes transgênicas obtidas a
10 partir de tais plantas oleaginosas, bem como o óleo ou subprodutos obtidos a partir dessas sementes transgênicas. Um produto preferencial é lecitina.

Em uma décima realização, a invenção refere-se a um alimento ou alimentação que incorpora um óleo ou semente da invenção, ou alimento ou
15 alimentação que compreende um ingrediente derivado do processo destas sementes.

Em uma décima primeira realização, a invenção refere-se a um método para produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa em uma célula vegetal que tem um nível de subprodutos ácidos graxos, cujo método compreende:

20 (a) transformar uma célula vegetal hospedeira com pelo menos um constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica pelo menos duas delta-8 desaturases, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e

(b) selecionar essas células vegetais hospedeiras transformadas
25 obtidas que têm um nível reduzido de subprodutos de ácidos graxos, em comparação ao nível desses subprodutos metabólicos de ácidos graxos em uma célula hospedeira transformada tendo pelo menos um constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma

delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a uma sequência reguladora.

Em uma décima segunda realização, a invenção refere-se à progênie de plantas obtidas a partir de uma planta produzida pelo método da invenção ou uma semente de planta oleaginosa da invenção.

5

DEPÓSITOS BIOLÓGICOS

O plasmídio a seguir foi depositado na Coleção Americana de Tipo de Cultura (ATCC), 10801 Universidade Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, e usa a designação, Número de Acesso e data de depósito a seguir (tabela 1).

10

TABELA 1

DEPÓSITO ATCC

Plasmídio	Número de Acesso	Data do Depósito
pKR72	PTA-6019	28 de maio de 2004

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E LISTA DE SEQUÊNCIAS

15

A invenção pode ser mais completamente entendida a partir da descrição detalhada, desenhos anexos e lista de sequências a seguir, que formam uma parte deste pedido.

A figura é uma via representativa de ácidos graxos omega-3 e omega-6 que fornece a conversão de ácido mirístico através de vários intermediários até DHA.

20

A figura 2 é um mapa do plasmídio pY115 (SEQ ID NO:34).

A figura 3 é um mapa do plasmídio pY175 (SEQ ID NO:35).

A figura 3B é um mapa do plasmídio pY176 (SEQ ID NO:36).

A figura 3C é um mapa do plasmídio pY177 (SEQ ID NO:37).

A figura 3D é um mapa do plasmídio pY178 (SEQ ID NO:38).

25

A figura 4 são os perfis de ácidos graxos para *Yarrowia lipolytica* que expressa pY175-pY178 (consulte Exemplo 4).

A figura 5 é um mapa do pY1152 (SEQ ID NO:47).

A figura 6 mostra a cromatografia do perfil lipídico de um extrato celular de *Euglena anabaena*, conforme descrito nos Exemplos.

As figuras 7A, 7B e 7C mostram um alinhamento Clustal V das sequências de delta-8 desaturase para EaD8Des1 (SEQ ID NO:21), EaD8Des2
 5 (SEQ ID NO:22), EaD8Des3 (SEQ ID NO:23) e EaD8Des4 (SEQ ID NO:24), e a sequência de aminoácidos de delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* (EgD8; SEQ ID NO:25; conforme descrito como Eg5 no pedido PCT documento WO 2006/012325).

A figura 8 é uma tabela que apresenta uma comparação da
 10 porcentagem de identidade (e porcentagem de divergência na metade triangular inferior) entre as cinco sequências de delta-8 desaturase alinhadas nas figuras 7A, 7B e 7C.

As figures 9A e 9B mostram uma comparação da sequência de nucleotídeos de EaD8Des3 (SEQ ID NO:19) e EaD8S (SEQ ID NO:48).

15 FIG. A figura 10 é um mapa do plasmídio pEaD8S (SEQ ID NO:49).

FIG. A figura 11 é um mapa do plasmídio pKR1150 (SEQ ID NO:60).

A figura 12 é um mapa do plasmídio pKR1192 (SEQ ID NO:66).

20 A figura 13 mostra a média dos perfis de ácidos graxos (média de 5 embriões somáticos de soja) para 5 eventos transformados com pKR1152 que tem a média mais alta de DGLA. Os ácidos graxos são identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oléico), LA, ALA, EDA, ERA, DGLA e ETA. Composições de ácido graxo são expressas como
 25 percentual em peso do total de ácidos graxos (% em peso) A atividade de alongamento é expressa como % de alongamento de ácidos graxos C18 de delta-9 elong.), calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$[(\text{produto})/(\text{substrato} + \text{produto})]*100$$
. Mais especificamente, a porcentagem de

alongamento combinada para LA e ALA é determinada como: $[(DGLA + ETA + EDA + ERA)/(LA + ALA + DGLA + ETA + EDA + ERA)] \times 100$. O percentual de dessaturação combinada para EDA e ERA é mostrado como "C20 % delta-8 desat", determinado como: $[(EDA + ERA)/(DGLA + ETA + EDA + ERA)] \times 100$.

5 Isto também é referido como % de dessaturação geral.

A figura 14 mostra a média dos perfis de ácidos graxos (média de 5 embriões somáticos de soja) para 5 eventos transformados com pKR1150 que tem a média mais alta de DGLA. Os ácidos graxos são identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oléico), LA, ALA, EDA,
 10 ERA, DGLA e ETA. Composições de ácido graxo são expressas como percentual em peso do total de ácidos graxos (% em peso) A atividade de alongamento é expressa como % de alongamento de ácidos graxos C18 de delta-9 elong.), calculada de acordo com a fórmula a seguir: $[(produto)/(substrato + produto)] \times 100$. Mais especificamente, a porcentagem de
 15 alongamento combinada para LA e ALA é determinada como: $[(DGLA + ETA + EDA + ERA)/(LA + ALA + DGLA + ETA + EDA + ERA)] \times 100$. O percentual de dessaturação combinada para EDA e ERA é mostrado como "C20 % delta-8 desat", determinado como: $[(EDA + ERA)/(DGLA + ETA + EDA + ERA)] \times 100$. Isto também é referido como % de dessaturação geral.

20 A figura 15 mostra o perfil lipídico da parte principal T2 da semente de *Arabidopsis* para 21 eventos de transformados. Os Ácidos graxos são identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oléico), LA, ALA, 20:0 (ácido eicosanóico), 20:1 (ácido eicosenóico), EDA, DGLA, ERA e ETA; e, ácidos são expressos como percentual em peso (% em
 25 peso) do total de ácidos graxos. O percentual de dessaturação combinada para EDA e ERA é mostrado como "C20 % delta-8 desat", determinado como: $[(EDA + ERA)/(DGLA + ETA + EDA + ERA)] \times 100$. Isto também é referido como % de dessaturação geral.

As descrições das sequências resumem a Lista de Sequências fornecida em anexo. A Lista de Sequências contém um código de letras para caracteres da sequência de nucleotídeo e códigos simples ou triplos para aminoácidos como definido nos padrões IUPAC-IUB descritos em *Nucleic Acids Research* 13:30213030 (1985) e no *Biochemical Journal* 219(2):345373 (1984).

SEQ ID NO:1 é a sequência de nucleotídeos da sequência parcial de delta-8 desaturase de *Euglena anabaena*.

SEQ ID NO:2 é a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase CDS de *Euglena gracilis* (Eg5).

A SEQ ID NO:3 é a sequência de nucleotídeos do *primer* esoepecifico para o vetor pDonor222Eg5-1.

A SEQ ID NO:4 é a sequência de nucleotídeos de D8DEG3-1.

A SEQ ID NO:5 é a sequência de nucleotídeos de D8DEG3-2.

A SEQ ID NO:6 é a sequência de nucleotídeos de D8DEG3-3.

A SEQ ID NO:7 é a sequência de nucleotídeos de D8DEG3-4.

A SEQ ID NO:8 é a sequência de nucleotídeos do *primer* T7.

A SEQ ID NO:9 é a sequência de nucleotídeos de M13-28Rev.

A SEQ ID NO:10 é a sequência de nucleotídeos de pHD23-1.

A SEQ ID NO:11 é a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* (número de acesso NCBI, AAD45877).

A SEQ ID NO:12 é a sequência de nucleotídeos de EaD8seq-1.

A SEQ ID NO:13 é a sequência de nucleotídeos de pLF118-1.

A SEQ ID NO:14 é a sequência de nucleotídeos de pLF118-2.

A SEQ ID NO:15 é a sequência de nucleotídeos de pLF118-3.

A SEQ ID NO:16 é a sequência de nucleotídeos de pLF118-4.

SEQ ID NO:17 é a sequência codificadora da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des1 CDS).

SEQ ID NO:18 é a sequência codificadora da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des2 CDS).

SEQ ID NO:19 é a sequência codificadora da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des3 CDS).

5 SEQ ID NO:20 é a sequência codificadora da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des4 CDS).

SEQ ID NO:21 é a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des1).

10 SEQ ID NO:22 é a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des2).

SEQ ID NO:23 é a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des3).

SEQ ID NO:24 é a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena* (EaD8Des4).

15 SEQ ID NO:25 é a sequência de aminoácidos correta da delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* (EgD8).

A SEQ ID NO:26 é a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo EaD8-5.

20 A SEQ ID NO:27 é a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo EaD8-3.

A SEQ ID NO:28 é a sequência de nucleotídeos de pLF120-1.

A SEQ ID NO:29 é a sequência de nucleotídeos de pLF120-2.

A SEQ ID NO:30 é a sequência de nucleotídeos de pLF120-3.

A SEQ ID NO:31 é a sequência de nucleotídeos de pLF120-4.

25 SEQ ID NO:32 é a sequência de nucleotídeos de pDMW263.

SEQ ID NO:33 é a sequência de nucleotídeos de pDMW237.

A SEQ ID NO:34 é a sequência de nucleotídeos de pY115.

A SEQ ID NO:35 é a sequência de nucleotídeos de pY175.

A SEQ ID NO:36 é a sequência de nucleotídeos de pY176.

A SEQ ID NO:37 é a sequência de nucleotídeos de pY177.

A SEQ ID NO:38 é a sequência de nucleotídeos de pY178.

5 SEQ ID NO:39 é a sequência codificadora para a delta-9 elongase
de *Euglena gracilis*.

SEQ ID NO:40 é a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo
sense oEugEL1-1 da elongase de *Euglena gracilis*.

SEQ ID NO:41 é a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo
sense oEugEL1-2 de *Euglena gracilis*.

10 A SEQ ID NO:42 é a sequência de nucleotídeos de pKR906.

A SEQ ID NO:43 é a sequência de nucleotídeos de pKR72.

A SEQ ID NO:44 é a sequência de nucleotídeos de pKR912.

A SEQ ID NO:45 é a sequência de nucleotídeos de pKR457.

A SEQ ID NO:46 é a sequência de nucleotídeos de pKR1138.

15 A SEQ ID NO:47 é a sequência de nucleotídeos de pKR1152.

SEQ ID NO:48 é a sequência de nucleotídeos do gene EaD8S
com codon otimizado.

A SEQ ID NO:49 é a sequência de nucleotídeos do plasmídeo
pEaD8S.

20 A SEQ ID NO:50 é a sequência de nucleotídeos de pLF121-1.

A SEQ ID NO:51 é a sequência de nucleotídeos de pLF121-2.

SEQ ID NO:52 é a sequência codificadora para a delta-9
elongase-1 de *Euglena anabaena* (EaD9Elo1).

SEQ ID NO:53 é a sequência codificadora para a delta-9
25 elongase-2 de *Euglena anabaena* (EaD9Elo2).

SEQ ID NO:54 é a sequência de aminoácidos para a delta-9
elongase-1 de *Euglena anabaena* (EaD9Elo1).

SEQ ID NO:55 é a sequência de aminoácidos para a delta-9

elongase-2 de *Euglena anabaena* (EaD9Elo2).

A SEQ ID NO:56 é a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo oEAd9el1-1.

5 A SEQ ID NO:57 é a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo oEAd9el1-2.

A SEQ ID NO:58 é a sequência de nucleotídeos de pKR1137.

A SEQ ID NO:59 é a sequência de nucleotídeos de pKR1140.

A SEQ ID NO:60 é a sequência de nucleotídeos de pKR1150.

A SEQ ID NO:61 é a sequência de nucleotídeos de pKR1173.

10 A SEQ ID NO:62 é a sequência de nucleotídeos de pKR393.

A SEQ ID NO:63 é a sequência de nucleotídeos de pKR407.

A SEQ ID NO:64 é a sequência de nucleotídeos de pKR1176.

A SEQ ID NO:65 é a sequência de nucleotídeos de pKR1178.

A SEQ ID NO:66 é a sequência de nucleotídeos de pKR1192.

15 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A divulgação de cada referência apresentada no presente pedido é integralmente incorporada ao mesmo como referência.

Como usado no presente pedido e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o/a” incluem os respectivos plurais, a menos
20 que o contexto claramente dite de outra forma. Dessa forma, por exemplo, referindo-se a “uma planta” deve-se incluir uma pluralidade de tais plantas e referindo-se a “uma célula” deve-se incluir uma ou mais células e equivalentes destas, conhecidas pelos técnicos no assunto, e assim por diante.

A presente invenção refere-se a enzimas delta-8 desaturases e
25 ácidos nucléicos para codificar as mesmas, isoladas a partir de *Euglena anabaena*. Estas são úteis, entre outras coisas, para a manipulação de vias bioquímicas para a produção de PUFAs saudáveis, entre outras coisas, Dessa forma, o assunto da invenção fornece várias aplicações. PUFAs, ou

derivados destes, fabricados pela metodologia divulgada no presente pedido, podem ser usados como substitutos de dietas, ou suplementos, particularmente nas fórmulas infantis, para pacientes com alimentação intravenosa ou para prevenção ou tratamento de nutrição deficiente. Alternativamente, os PUFAs

5 purificados (ou derivados destes) podem ser incorporados nos óleos de cozinha, gorduras e margarinas formuladas para que no uso normal o receptor receba a quantidade desejada para a suplementação da dieta. Os PUFAs também podem ser incorporados nas fórmulas infantis, suplementos nutricionais ou outros produtos e podem ser úteis como agentes anti-

10 inflamatórios ou redutores do colesterol. Opcionalmente, as composições podem ser usadas para uso farmacêutico (humano ou veterinário). Neste caso, os PUFAs são geralmente administrados oralmente, mas podem ser administrados por qualquer rota na qual eles possam ser absorvidos com sucesso, por exemplo, por via parenteral (por exemplo, subcutânea,

15 intramuscular ou intravenosa), retal, vaginal ou tópica (por exemplo, como uma pomada ou loção para pele).

A suplementação para humanos ou animais com PUFAs produzidos por métodos recombinantes pode resultar em níveis elevados dos PUFAs adicionados, bem como sua progênie metabólica. Por exemplo, o

20 tratamento com EPA pode resultar não apenas em níveis elevados de EPA, mas também nos produtos a jusante de EPA, como eicosanóides (isto é, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos). Mecanismos reguladores complexos podem tornar desejável combinar vários PUFAs, ou adicionar diferentes conjugados de PUFAs, a fim de evitar, controlar ou superar tais

25 mecanismos, para alcançar os níveis desejados de PUFAs específicos em um indivíduo.

No contexto desta divulgação, vários termos e abreviações são utilizados. São fornecidas definições a seguir.

"Fase aberta de leitura" é abreviada como ORF.

"Reação em cadeia da polimerase" é abreviada como PCR.

"Coleção Americana de Tipos de Cultura" é abreviada como ATCC.

5 "Ácido(s) graxo(s) poliinsaturado(s)" é(são) abreviado(s) como PUFA(s).

"Triacilgliceróis" são abreviados como TAGs.

O termo "ácidos graxos" refere-se aos ácidos alifáticos de cadeia longa (ácidos alcanóicos) com comprimento da cadeia variável, de
10 aproximadamente C₁₂ a C₂₂ (embora ácidos com comprimentos de cadeia mais longos e mais curtos sejam conhecidos). Os comprimentos de cadeia predominantes estão entre C₁₆ e C₂₂. Detalhes adicionais com relação à diferenciação entre "ácidos graxos saturados" e "ácidos graxos insaturados", "ácidos graxos monoinsaturados" e "ácidos graxos poliinsaturados" (ou
15 "PUFAs"), e "ácidos graxos ômega-6" (ω-6 ou n-6) e "ácidos graxos ômega-3" (ω-3 ou n-3) são fornecidos na Publicação PCT documento WO 2004/101757.

Ácidos graxos são descritos no presente pedido por um sistema simples de notação de "X:Y", sendo que X é o número de átomos de carbono (C) no ácido graxo específico e Y é o número depois das ligações duplas. O
20 número que segue a designação do ácido graxo indica a posição da ligação dupla na terminação carboxila do ácido graxo com o "c" anexo para a configuração *cis* da ligação dupla (por exemplo, ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1, 9c), ácido petroselinico (18:1, 6c), LA (18:2, 9c,12c), GLA (18:3, 6c,9c,12c) e ALA (18:3, 9c,12c,15c)). A menos que
25 especificado de outra forma, 18:1, 18:2 e 18:3 referem-se a ácido graxo oléico, LA e ALA, respectivamente. Se não especificamente descrito de outra forma, assume-se que ligações duplas sejam de configuração *cis*. Por exemplo, as duplas ligações no 18:2 (9,12) poderiam ser assumidas como sendo de

configuração *cis*.

A nomenclatura utilizada para descrever PUFA's na presente divulgação é mostrada abaixo na Tabela 2. Na coluna intitulada "Símbolo", o sistema de referência ômega é usado para indicar o número de carbonos, o número de ligações duplas e a posição da ligação dupla mais próxima do carbono ômega, contando a partir do carbono ômega (que é numerado 1 para este propósito). O restante da Tabela resume os nomes comuns de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e seus precursores, as abreviações que serão usadas por todo restante do relatório descritivo, e o nome químico de cada composto.

TABELA 2

NOMENCLATURA DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E PRECURSORES

Nomenclatura Comum	Abreviação	Nomenclatura Química	Notação Estenográfica
mirístico	--	tetradecanóico	14:0
palmítico	PA	hexadecanóico	16:0
palmitoléico	--	9-hexadecenóico	16:1
esteárico	--	octadecanóico	18:0
oléico	--	<i>cis</i> -9-octadecenóico	18:1
linoléico	LA	<i>cis</i> -9,12-octadecadienóico	18:2 ω-6
gama-linolênico	GLA	<i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienóico	18:3 ω-6
eicosadienóico	EDA	<i>cis</i> -11,14-eicosadienóico	20:2 ω-6
diomo-gama-linolênico	DGLA	<i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienóico	20:3 ω-6
sciadônico	SCI	<i>cis</i> -5,11,14-	20:3b ω-6

Nomenclatura Comum	Abreviação	Nomenclatura Química	Notação Estenográfica
		eicosatrienóico	
araquidônico	ARA	<i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenóico	20:4 ω -6
alfa-linolênico	ALA	<i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	18:3 ω -3
estearidônico	STA	<i>cis</i> -6,9,12,15-octadecatetraenóico	18:4 ω -3
eicosatrienóico	ETrA ou ERA	<i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienóico	20:3 ω -3
eicosatetraenóico	ETA	<i>cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenóico	20:4 ω -3
juniperônico	JUP	<i>cis</i> -5,11,14,17-eicosatrienóico	20:4b ω -3
eicosapentaenóico	EPA	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	20:5 ω -3
docosa-pentaenóico	DPA	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenóico	22:5 ω -3
docosa-hexaenóico	DHA	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	22:6 ω -3

Uma via metabólica ou via biossintética, no sentido bioquímico, pode ser considerada como uma série de reações químicas que ocorrem dentro de uma célula, catalisadas por enzimas, para alcançar tanto a formação de um produto metabólico a ser usado ou armazenado pela célula, como para

5 iniciação de outra via metabólica (então chamada de etapa de geração de fluxo). Muitas destas vias são elaboradas e envolvem modificações em etapas destas substâncias iniciais para formar um produto tendo exatamente a

estrutura química desejada.

O termo "via biossintética do PUFA" refere-se a um processo metabólico que converte ácido oléico em LA, EDA, GLA, DGLA, ARA, ALA, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHA. Este processo está bem descrito na literatura (por exemplo, consulte Publicação PCT documento WO 2006/052870). De forma simples, este processo envolve o alongamento da cadeia de carbono por meio da adição de átomos de carbono e dessaturação da molécula através da adição de ligações duplas, por uma série de dessaturações especiais e enzimas de alongamento (isto é, "enzimas da via biossintética do PUFA") presentes na membrana do retículo endoplasmático. Mais especificamente, "enzima da via biossintética do PUFA" refere-se a qualquer uma das enzimas a seguir (e genes que codificam ditas enzimas) associadas com a via biossintética do PUFA, incluindo: uma delta-4 desaturase, uma delta-5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma C_{14/16} elongase, uma C_{16/18} elongase, uma C_{18/20} elongase e/ou uma C_{20/22} elongase.

O termo "via biossintética de ácido graxo ômega-3/ômega-6" refere-se a um conjunto de genes, que quando expressos mediante condições apropriadas, codificam enzimas que catalisam a produção tanto de ácidos graxos ômega-3 como ômega-6. Tipicamente, os genes envolvidos na via biossintética de ácido graxo ômega-3/ômega-6 codificam as enzimas da via biossintética do PUFA. Uma via representativa é ilustrada na FIG. 1, fornecendo a conversão de ácido mirístico através de vários intermediários até DHA, que demonstra como ambos ácidos graxos, ômega-3 e ômega-6 podem ser produzidos a partir de uma fonte comum. A via é naturalmente dividida em duas porções, onde uma porção irá gerar os ácidos graxos ômega-3 e a outra porção, os ácidos graxos ômega-6.

O termo "funcional", como usado no presente pedido, no contexto da via biossintética de ácido graxo ômega-3/ômega-6 significa que alguns (ou todos) os genes na via expressam enzimas ativas, resultando na catálise *in vivo* ou na conversão de substrato. Deve-se entender que "via biossintética de ácido graxo ômega-3/ômega-6" ou "via biossintética funcional de ácido graxo ômega-3/ômega-6" não implica que todos os genes para as enzimas da via biossintética do PUFA sejam necessários, já que muitos produtos ácidos graxos necessitam apenas da expressão de um subgrupo dos genes desta via.

O termo "via delta-9 elongase/delta-8 desaturase" refere-se a uma via biossintética para produção de PUFA de cadeia longa. Esta via, no mínimo, compreende uma delta-9 elongase e uma delta-8 desaturase, através disso permitindo a biossíntese de DGLA e/ou ETA a partir de LA e ALA, respectivamente. Com a expressão de outras desaturases e elongases, ARA, EPA, DPA e DHA também podem ser sintetizados. Esta via pode ser vantajosa em algumas realizações, já que a biossíntese de GLA e/ou STA é excluída.

O termo "ácido graxo intermediário" refere-se a qualquer ácido graxo produzido em uma via metabólica de ácido graxo que possa ser, ainda, convertido em um produto ácido graxo pretendido nesta via, pela ação de outras enzimas da via metabólica. Por exemplo, quando EPA é produzido usando-se a via delta-9 elongase/delta-8 desaturase, EDA, ETrA, DGLA, ETA e ARA podem ser produzidos e são considerados "ácidos graxos intermediários", já que esses ácidos graxos podem ser, ainda, convertidos em EPA através da ação de outras enzimas da via metabólica.

O termo "subproduto ácido graxo" refere-se a qualquer ácido graxo produzido em uma via metabólica de ácido graxo que não é o produto ácido graxo pretendido da via, nem um "intermediário de ácido graxo" da via. Por exemplo, quando EPA é produzido usando-se a via delta-9, o ácido sciadônico (SCI) e o ácido juniperônico (JUP) também podem ser produzidos

pela ação de uma delta-5 desaturase tanto no EDA como ETrA, respectivamente. Eles são considerados “subprodutos ácidos graxos”, já que não podem ser convertidos em EPA pela ação de outras enzimas da via metabólica.

5 Os termos “triacilglicerol”, “óleo” e “TAGs” referem-se a lipídeos neutros compostos de três resíduos acil estereificados para uma molécula de glicerol (e tais termos serão usados alternadamente por toda presente divulgação no presente pedido). Tais óleos podem conter PUFAs de cadeia longa, bem como ácidos graxos saturados e insaturados mais curtos e ácidos
10 graxos saturados de cadeias mais longas. Dessa forma, “biossíntese de óleo” refere-se genericamente à síntese de TAGs na célula.

“Percentual (%) de PUFAs no lipídeo total e frações de óleo” refere-se ao percentual de PUFAs relativo aos ácidos graxos totais nessas frações. O termo “fração de lipídeo total” ou “fração de lipídeo” ambos referem-
15 se à soma de todos os lipídeos (isto é, neutros e polares) dentro de um organismo oleaginoso, dessa forma, incluindo aqueles lipídeos que estão localizados na fração fosfatidilcolina (PC), fração fosfatidiletanolamina (PE) e fração triacilglicerol (TAG ou óleo). No entanto, os termos “lipídeo” e “óleo” serão usados alternadamente ao longo do relatório descritivo.

20 Os termos “eficiência de conversão” e “percentual de conversão de substrato” referem-se à eficiência pela qual uma enzima específica (por exemplo, desaturase) pode converter substrato em produto. A eficiência de conversão é medida de acordo com a seguinte fórmula: $[(\text{produto})/(\text{substrato} + \text{produto})] \times 100$, onde “produto” inclui o produto direto e todos os produtos na via,
25 derivados deste.

“Desaturase” é um polipeptídeo que pode dessaturar, isto é, introduzir uma ligação dupla em um ou mais ácidos graxos para produzir um ácido graxo precursor de interesse. Apesar do uso do sistema de referência de

ômega ao longo de todo relatório descritivo para se referir aos ácidos graxos específicos, é mais conveniente indicar a atividade de uma desaturase pela contagem a partir da terminação carboxila do substrato usando-se o sistema de delta. São de interesse particular no presente pedido as delta-8 desaturases

5 que irão dessaturar um ácido graxo entre o oitavo e o nono átomo de carbono, numerado a partir da terminação carboxila da molécula e que podem, por exemplo, catalisar a conversão de EDA para DGLA e/ou ETrA para ETA. Outras desaturases de ácidos graxos úteis incluem, por exemplo: (1) delta-5 desaturases que catalisam a conversão de DGLA para ARA e/ou ETA para

10 EPA; (2) delta-6 desaturases que catalisam a conversão de LA para GLA e/ou ALA para STA; (3) delta-4 desaturases que catalisam a conversão de DPA para DHA; (4) delta 12 desaturases que catalisam a conversão de ácido oléico para LA; (5) delta-15 desaturases que catalisam a conversão de LA para ALA e/ou GLA to STA; (6) delta-17 desaturases que catalisam a conversão de ARA para

15 EPA e/ou DGLA para ETA; e (7) delta-9 desaturases que catalisam a conversão de ácido palmítico para ácido palmitoléico (16:1) e/ou ácido esteárico para ácido oléico (18:1). Na técnica, delta-15 e delta-17 desaturases também são ocasionalmente chamadas de "ômega-3 desaturases", "w-3 desaturases", e/ou "ω-3 desaturases", com base nas suas capacidades de

20 converter ácido graxo ômega-6 em seus similares ômega-3 (por exemplo, conversão de LA para ALA e ARA para EPA, respectivamente). Em algumas realizações, é mais desejável determinar empiricamente a especificidade de uma desaturase de ácido graxo específica pela transformação de um hospedeiro adequado com o gene para a desaturase de ácido graxo e seu

25 efeito no perfil do ácido graxo do hospedeiro.

Para os propósitos do presente pedido, o termo "EaD8Des1" refere-se a uma enzima delta-8 desaturase (SEQ ID NO:21) isolada a partir de *Euglena anabaena*, codificada pela SEQ ID NO:17 no presente pedido. O

termo "EaD8Des2" refere-se a uma enzima delta-8 desaturase (SEQ ID NO:22) isolada a partir de *Euglena anabaena*, codificada pela SEQ ID NO:18 no presente pedido. O termo "EaD8Des3" refere-se a uma enzima delta-8 desaturase (SEQ ID NO:23) isolada a partir de *Euglena anabaena*, codificada pela SEQ ID NO:19 no presente pedido. O termo "EaD8Des4" refere-se a uma enzima delta-8 desaturase (SEQ ID NO:24) isolada a partir de *Euglena anabaena*, codificada pela SEQ ID NO:20 no presente pedido.

De modo similar, o termo "EgD8" refere-se a uma enzima delta-8 desaturase (SEQ ID NO:2 é a sequência de ácidos nucléicos codificadora) isolada a partir de *Euglena gracilis*. EgD8 é 100% idêntica e funcionalmente equivalente à "Eg5", conforme descrito nas Publicações PCT documento WO 2006/012325 e documento WO 2006/012326 (SEQ ID NO:2 da Publicação US N° 20050287652-A1).

O termo "sistema elongase" refere-se a um conjunto de quatro enzimas que são responsáveis pelo alongamento de uma cadeia de carbono de ácido graxo para produzir um ácido graxo que tem em comprimento dois carbonos a mais que o substrato de ácido graxo no qual o sistema elongase age. Mais especificamente, o processo de alongamento ocorre em associação com a ácido graxo sintase, por meio da qual CoA é o carreador de acil (Lassner *et al.*, *Plant Cell* 8:281-292 30 (1996)). Na primeira etapa, descobriu-se que ambas são específicas para o substrato e também limitantes de taxa, a malonil-CoA é condensada com uma acil-CoA de cadeia longa para produzir dióxido de carbono (CO₂) e um β -cetoacil-CoA (onde o componente acil foi alongado com dois átomos de carbono). Reações subsequentes incluem redução para β -hidroxiacil-CoA, desidratação para um enoil-CoA e uma segunda redução para produzir acil-CoA alongada. Exemplos de reações catalisadas pelo sistema elongase são a conversão de GLA para DGLA, STA para ETA, LA para EDA, ALA para ETRA e EPA para DPA.

Para os propósitos do presente pedido, uma enzima que catalisa a primeira reação de condensação (isto é, conversão de malonil-CoA e acil-CvoA para β -cetoacil-CoA) será denominada genericamente de "elongase". Em geral, a seletividade de elongases para o substrato é um tanto ampla, mas

5 diferenciada tanto pelo comprimento da cadeia como pelo grau de insaturação. Consequentemente, elongases podem ter especificidades diferentes. Por exemplo, uma $C_{14/16}$ elongase irá utilizar um substrato C_{14} (por exemplo, mirístico), uma $C_{16/18}$ elongase irá utilizar um substrato C_{16} (por exemplo, palmitato), uma $C_{18/20}$ elongase irá utilizar um substrato C_{18} (por exemplo, GLA,

10 STA) e uma $C_{20/22}$ elongase irá utilizar um substrato C_{20} (por exemplo, EPA). De modo similar, uma "delta-9 elongase" pode ser capaz de catalisar a conversão de LA para EDA e/ou ALA para ETrA. É importante notar que algumas elongases possuem ampla especificidade e, dessa forma, uma única enzima pode ser capaz de catalisar diversas reações de elongase. Dessa

15 forma, por exemplo, uma delta-9 elongase também pode agir como uma elongase $C_{16/18}$, elongase $C_{18/20}$, elongase $C_{20/22}$ e pode ter especificidades alternadas, mas não preferidas, para ácidos graxos delta-5 e delta-6 como EPA e/ou GLA, respectivamente.

Para os propósitos do presente pedido, o termo "IgD9e" refere-se

20 a uma delta-9 elongase (número de acesso NCBI, AAL37626 [GI 17226123], *locus* AAL37626, CDS AF390174; número de acesso GenBank, AF390174) isolada a partir de *Isochrysis galbana*. Ao contrário, o termo "IgD9eS" refere-se a uma delta-9 elongase sintética (códon-otimizada) derivada a partir da sequência de DNA da delta-9 elongase de *Isochrysis galbana*, que pode ser

25 usada para expressão em *Yarrowia lipolytica*.

De modo similar, para os propósitos do presente pedido, termo "EgD9e" refere-se a uma delta-9 elongase de *Euglena gracilis*, codificada pela SEQ ID NO:39 (consulte Example 5 no presente pedido).

Como usado no presente pedido, "ácido nucléico" significa um polinucleotídeo e inclui um polímero de fita simples ou dupla de bases de desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos. Os ácidos nucléicos também podem incluir fragmentos e nucleotídeos modificados. Dessa forma, os termos

5 "polinucleotídeo", "sequência de ácidos nucléicos", "sequência de nucleotídeos" ou "fragmento de ácido nucléico" são usados alternadamente para um polímero de RNA ou DNA de fita simples ou dupla, que opcionalmente contém bases de nucleotídeos sintéticos, não naturais ou alterados. Nucleotídeos (usualmente encontrados na forma 5'-monofosfato) são designados por uma única uma

10 letra, como a seguir: "A" para adenilato ou desoxiadenilato (para RNA ou DNA, respectivamente), "C" para citidilato ou desoxicitidilato, "G" para guanilato ou desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A ou G), "Y" para pirimidinas (C ou T), "K" para G ou T, "H" para A, C ou T, "I" para inosina, e "N" para qualquer nucleotídeo.

15 Os termos "subfragmento que é funcionalmente equivalente" e "subfragmento funcionalmente equivalente" são usados alternadamente no presente pedido. Estes termos referem-se a uma porção ou subsequência de um fragmento de ácido nucléico isolado nos quais a capacidade para alterar a expressão gênica ou produzir certo fenótipo é mantida, mesmo se o fragmento

20 ou subfragmento codificar ou não uma enzima ativa. Por exemplo, o fragmento ou subfragmento pode ser usado no projeto de genes quiméricos para produzir o fenótipo desejado em uma planta transformada. Genes quiméricos podem ser designados para o uso na supressão pela ligação de um fragmento de ácido nucléico ou subfragmento deste, se este codificar ou não uma enzima

25 ativa, na orientação *sense* ou *antisense* relativa a uma sequência promotora da planta.

O termo "domínio conservado" ou "*motif*" significa um conjunto de aminoácidos conservados nas posições específicas ao longo de uma

sequência alinhada de proteínas relacionadas evolutivamente. Embora aminoácidos em outras posições possam variar entre proteínas homólogas, aminoácidos altamente conservados nas posições específicas indicam aminoácidos essenciais na estrutura, estabilidade ou atividade de uma

5 proteína. Pelo fato deles serem identificados por seu alto grau de conservação nas sequências alinhadas de uma família de proteínas homólogas, eles podem ser usados como identificadores, ou "assinaturas", para determinar se uma proteína com uma sequência recentemente determinada pertence a uma família de proteínas previamente identificada.

10 Os termos "homologia", "homólogo", "substancialmente similar" e "que corresponde substancialmente" são usados alternadamente no presente pedido. Eles se referem aos fragmentos de ácido nucléico em que as trocas em um ou mais bases de nucleotídeos não afetam a capacidade do fragmento de ácido nucléico mediar a expressão gênica ou produzir certo fenótipo. Estes

15 termos também se referem a modificações dos fragmentos de ácido nucléico da presente invenção, como a deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos que não alteram substancialmente as propriedades funcionais do fragmento de ácido nucléico resultante, relativas ao fragmento inicial, não modificado. Entende-se, então, como os técnicos no assunto irão apreciar, que a invenção

20 engloba mais do que sequências exemplares específicas.

Além disso, o técnico no assunto reconhece que sequências de ácidos nucléicos substancialmente similares englobadas por esta invenção também podem ser definidas pela suas capacidades em hibridizar (mediante condições moderadas de estringência, por exemplo, 0,5X SSC, SDS a 0,1%,

25 60°C) com a sequência exemplificada no presente, ou com qualquer porção das sequências de nucleotídeos divulgadas no presente pedido e que são funcionalmente equivalentes a qualquer uma das sequências de ácidos nucléicos divulgadas no presente pedido. Condições de estringência podem

ser ajustadas para selecionar fragmentos moderadamente similares, como sequências homólogas de organismos relacionados de forma distante, até fragmentos altamente similares, como genes que duplicam enzimas funcionais de organismos intimamente relacionados. A pós-hibridização lava
5 determinadas condições de estringência.

O termo “hibridiza seletivamente” inclui referência à hibridização, mediante condições de hibridização estrigente de uma sequência de ácido nucléico para uma sequência alvo de ácido nucléico a um grau mais detectável (por exemplo, pelo menos 2 vezes além do anterior) do que sua hibridização
10 para sequências de ácido nucléico não alvo e para exclusão substancial de ácidos nucléicos não alvos. Sequências que hibridizam seletivamente, tipicamente possuem cerca de pelo menos 80% de identidade de sequência ou 90% de identidade de sequência, até e incluindo 100% de identidade de sequência (isto é, completamente complementar) uma em relação à outra.

O termo “condições estringentes” ou “condições de hibridização estrigente” inclui referência às condições mediante as quais uma sonda seletivamente hidridiza à sua sequência alvo. Condições estringentes são dependentes da sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Pelo controle da estringência e/ou condições de hibridização e lavagem, as
20 sequências alvo 100% complementares à sonda podem ser identificadas (sondagem homóloga). Alternativamente, condições de estringência podem ser ajustadas para permitir algumas combinações mal sucedidas nas sequências, de forma que os baixos graus de similaridade sejam detectados (sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda é menor que cerca de 1000
25 nucleotídeos em comprimento, opcionalmente menor que 500 nucleotídeos em comprimento.

Tipicamente, condições de estringência serão aquelas em que a concentração de sal é menor que cerca de 1,5 M de íon Na, tipicamente cerca

- de 0,01 a 1,0 M de concentração de íon Na (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos aproximadamente 60°C para sondas longas (por exemplo, maiores que 50 nucleotídeos). Condições de
- 5 estringência podem ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizantes, como formamida. Condições de baixa estringência exemplares incluem hibridização com uma solução tampão de formamida a 30 até 35%, NaCl a 1 M, SDS a 1% (dodecil sulfato de sódio) a 37°C, e uma lavagem em 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl a 3,0 M/citrato trissódico a 0,3 M) a 50 a 55°C.
- 10 Condições de estringência moderada exemplares incluem hibridização em formamida a 40% até 45%, NaCl a 1 M, SDS a 1% a 37 °C, e uma lavagem em 0,5X a 1X SSC a 50°C até 60°C. Condições de alta estringência exemplares incluem hibridização em formamida a 50%, NaCl a 1 M, SDS a 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1X SSC a 60°C até 65°C.
- 15 Especificidade é tipicamente a função de lavagens de pós-hibridização, os fatores críticos sendo, força iônica e temperatura da solução final de lavagem. Para DNA-DNA híbridos, a T_m pode ser aproximada a partir da equação de Meinkoth *et al.*, *Anal. Biochem.* 138:267-284 (1984): $T_m = 81,5$
- 20 de cátions monovalentes, %GC é a porcentagem de nucleotídeos guanosina e citosina no DNA, % form é a porcentagem de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido nos pares de base. A T_m é a temperatura (mediante força iônica definida e pH) na qual 50% de uma sequência alvo complementar hibridiza com uma sonda perfeitamente
- 25 complementar. A T_m é reduzida por cerca de 1°C para cada 1% de combinações mal sucedidas, dessa forma, T_m , hibridização e/ou condições de lavagem podem ser ajustadas para hibridizar com as sequências de identidade desejada. Por exemplo, se sequências com identidade >90% são procuradas,

a T_m pode ser diminuída em 10°C. Geralmente, as condições de estringência são selecionadas para ser aproximadamente 5°C abaixo do ponto de fusão (T_m) para a sequência específica e seu complemento a uma força iônica e pH definidos. No entanto, condições severamente estringentes podem utilizar uma

5 hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3, ou 4°C mais baixo do que o ponto de fusão (T_m); condições moderadamente estringentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9, ou 10°C mais baixo do que o ponto de fusão (T_m); condições de baixa estringência podem utilizar uma hibridização a 11, 12, 13, 14, 15, ou 20°C mais baixo do que o ponto de fusão (T_m). Usando-se a

10 equação, hibridização e composições de lavagem, e T_m desejadas, os técnicos no assunto entenderão que variações na estringência de hibridização e/ou soluções de lavagem estão basicamente descritas. Se o grau desejado de combinações mal sucedidas resultar em uma T_m menor que 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida) é preferível aumentar a concentração

15 de SSC, de forma que uma temperatura mais alta possa ser usada. Uma orientação extensa para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrada em Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays",

20 Elsevier, Nova York (1993); e *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel *et al.*, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova York (1995). Hibridização e/ou condições de lavagem podem ser aplicadas por pelo menos 10, 30, 60, 90, 120, ou 240 minutos.

"Identidade de sequência" ou "identidade", no contexto de

25 sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos, refere-se às bases de ácidos nucleicos ou resíduos de aminoácidos em duas sequências iguais, quando alinhadas para a máxima correspondência sobre uma janela de comparação específica.

Dessa forma, "porcentagem de identidade de sequência" refere-se ao valor determinado pela comparação de duas sequências alinhadas da melhor forma sobre uma janela de comparação, sendo que a porção da sequência de polinucleotídeo ou polipeptídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, *gaps*), em comparação à sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para a melhor forma de alinhamento das duas sequências. A porcentagem é calculada pela determinação do número de posições nas quais a base de ácido nucléico ou resíduo de aminoácido idêntico ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições compatíveis, dividindo-se o número de posições compatíveis pelo total do número de posições na janela de comparação e multiplicando o resultado por 100 para produzir a porcentagem de identidade de sequência. Exemplos úteis de percentual de identidade de sequência incluem, mas não se limitam a 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95%, ou qualquer porcentagem de número inteiro de 50% a 100%.

Estas identidades podem ser determinadas usando-se qualquer um dos programas descritos no presente pedido.

Alinhamentos de sequência e porcentagem de identidade ou cálculos de similaridade podem ser determinados usando-se uma variedade de métodos de comparação projetados para detectar sequências homólogas, incluindo, mas se limitando a, programa MegAlign™ do conjunto de computação de bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Dentro do contexto desta aplicação, deve-se entender que onde os programas de análise de sequências forem utilizados para análise, os resultados das análises serão baseados nos "parâmetros básicos" do programa referido, a menos que especificado de outra forma. Como usado no presente pedido "parâmetros básicos" significa qualquer conjunto de valores ou parâmetros que originalmente são carregados no programa, quando inicializado pela primeira

vez.

O "Método de alinhamento Clustal V" corresponde ao método de alinhamento designado Clustal V (descrito por Higgins e Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. *et al.* (1992) *Comput. Appl. Biosci* 8:189-191) e encontrado no programa MegAlign™ do conjunto de computação de bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Para múltiplos alinhamentos, os parâmetros básicos correspondem a PENALIDADE PARA GAP=10 e PENALIDADE DE EXTENSÃO DE GAP=10. Os parâmetros básicos para alinhamentos de pareamento e cálculo de percentual de identidade de sequências de proteínas usando-se o método Clustal são KTUPLE=1, PENALIDADE DE GAP=3, JANELA=5 e DIAGONAIS SALVAS=5. Para os ácidos nucleicos, estes parâmetros são KTUPLE=2, PENALIDADE DE GAP=5, JANELA=4 e DIAGONAIS SALVAS=4. Após o alinhamento das sequências usando-se o programa Clustal V, é possível se obter uma "porcentagem de identidade" visualizando a tabela de "distância das sequências" no mesmo programa.

"Método de Alinhamento BLASTN" é um algoritmo fornecido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) para comparar sequências de nucleotídeos usando-se parâmetros básicos.

É bem entendido por um técnico no assunto que muitos níveis de identidade de sequência são úteis na identificação de polipeptídeos de outras espécies, em que tais polipeptídios possuem a mesma função ou atividade, ou similar. Exemplos úteis de percentuais de identidade incluem, mas não se limitam a 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95%, ou qualquer porcentagem de número inteiro de 50% a 100%. Realmente, qualquer número inteiro de identidade de aminoácido de 50% até 100% podem ser úteis na descrição da presente invenção, como 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%,

69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. É também de interesse qualquer complemento inteiro ou parcial deste fragmento de nucleotídeo isolado.

5 Gene “refere-se” a um fragmento de ácido nucléico que expressa uma proteína específica, incluindo sequências reguladoras anteriores (sequências não codificadoras 5') e posteriores (sequências não codificadoras 3') da sequência codificadora. “Gene nativo” refere-se a um gene como encontrado na natureza, com suas próprias sequências reguladoras. “Gene quimérico” refere-se a qualquer gene não nativo, que compreende sequências reguladoras e codificadoras que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências codificadoras derivadas de diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências codificadoras derivadas da mesma fonte, 10 mas organizadas de uma maneira diferente daquela encontrada na natureza. Um gene “estranho” refere-se a um gene não encontrado normalmente no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo hospedeiro por transferência gênica. Genes estranhos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo, ou genes quiméricos. Um “transgene” 15 é um gene que foi introduzido no genoma por um processo de transformação. 20

O termo “genoma” como aplicado a células vegetais engloba não apenas o DNA cromossomal encontrado dentro do núcleo, mas também DNA de organelas, encontrado dentro de componentes subcelulares da célula (por exemplo, mitocondrial, plastidial).

25 Um “gene com otimização de códon” é um gene que possui sua frequência de uso de códon projetada para imitar a frequência de uso de códon preferida da célula hospedeira.

Um “alelo” é uma das várias formas alternativas de um gene que

ocupa um dado *locus* em um cromossomo. Quando todos os alelos presentes em um dado *locus* em um cromossomo são os mesmos, essa planta é homozigota para esse *locus*. Se os alelos presentes em um dado *locus* em um cromossomo diferem, essa planta é heterozigota para esse *locus*.

5 “Sequência codificadora” refere-se a uma sequência de DNA que codifica uma sequência específica de aminoácidos. “Sequências reguladoras” referem-se às sequências de nucleotídeos localizadas a montante (sequências não codificadoras 5’), no interior, ou a jusante (sequências não codificadoras 3’) de uma sequência codificadora, e que influencia a transcrição, processamento
10 ou estabilidade do RNA, ou tradução da sequência codificadora associada. Sequências reguladoras podem incluir, mas não se limitam a: promotores, sequências líderes de tradução, introns, sequências de reconhecimento de poliadenilação, sítios de processamento de RNA, sítios de ligação efetora e estruturas haste-alça.

15 “Promotor” refere-se a uma sequência de DNA capaz de controlar a expressão de uma sequência codificadora ou RNA funcional. A sequência promotora consiste de elementos próximos ou mais distantes a montante, os elementos finais são frequentemente denominados *enhancers*. Consequentemente, um “*enhancer*” é uma sequência de DNA que pode
20 estimular a atividade do promotor, e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo, inserido para aumentar o nível ou especificidade ao tecido de um promotor. Promotores podem ser derivados em sua totalidade de um gene nativo ou podem ser compostos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados na natureza, ou até compreender
25 segmentos sintéticos de DNA. Os técnicos no assunto entendem que diferentes promotores podem dirigir a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos celulares, em diferentes estágios do desenvolvimento, ou em resposta a diferentes condições ambientais. É ainda reconhecido que, já que

em muitos casos os limites exatos das sequências reguladoras não foram completamente definidos, fragmentos de DNA com alguma variação podem ter atividade idêntica à do promotor. Promotores que induzem um gene a se expressar na maioria dos tipos celulares são comumente denominados

5 “promotores constitutivos”. Novos promotores de vários tipos úteis nas células vegetais estão constantemente sendo descobertos; vários exemplos podem ser encontrados na compilação por Okamuro, J. K., e Goldberg, R. B. *Biochemistry of Plants* 15:1-82 (1989).

“Sequência líder de tradução” refere-se a uma sequência de

10 polinucleotídeo localizada entre a sequência promotora de um gene e a sequência codificadora. A sequência líder de tradução está presente no mRNA completamente processado a montante da sequência iniciadora da tradução. A sequência líder de tradução pode afetar o processamento do transcrito primário para mRNA, estabilidade ou eficiência de tradução do mRNA. Exemplos de

15 sequências líder de tradução foram descritos (Turner, R. e Foster, G. D., *Mol. Biotechnol.* 3:225-236 (1995)).

“Sequências não codificadoras 3' ”, “terminador de transcrição” ou “sequências de terminação” referem-se às sequências de DNA localizadas a jusante de uma sequência codificadora e inclui sequências de reconhecimento

20 de poliadenilação e outras sequências que codificam sinais reguladores capazes de afetar o processamento do mRNA ou expressão gênica. O sinal de poliadenilação é usualmente caracterizado por afetar a adição de trechos de ácido poliadenílico à extremidade 3' do mRNA precursor. O uso de diferentes sequências não codificadoras 3' é exemplificado por Ingelbrecht, I. L., *et al*

25 *Plant Cell* 1:671-680 (1989).

“RNA transcrito” refere-se ao produto resultante da transcrição catalisada pela RNA polimerase de uma sequência de DNA. Quando o RNA transcrito é uma cópia complementar perfeita da sequência de DNA, é

denominado transcrito primário. Um RNA transcrito é denominado RNA maduro quando este é uma sequência de RNA derivada do processamento pós-transcricional do transcrito primário. "RNA mensageiro" ou "mRNA" refere-se ao RNA que está sem introns e que pode ser traduzido em proteínas pela célula. "cDNA" refere-se a um DNA complementar que é sintetizado a partir de um molde de RNA usando-se a enzima transcriptase reversa. O cDNA pode ser de fita simples ou convertido para a forma de fita dupla usando-se o fragmento Klenow da DNA polimerase I. RNA "*sense*" refere-se ao RNA transcrito que inclui o mRNA e pode ser traduzido em proteína dentro de uma célula ou *in vitro*. "RNA *antisense*" refere-se a um RNA transcrito que é complementar a todo ou parte de um transcrito primário alvo ou mRNA, e que bloqueia a expressão de um gene alvo (patente US 5.107.065). A complementaridade de um RNA *antisense* pode ser com qualquer parte do gene transcrito específico, isto é, na sequência não codificadora 5', sequência não codificadora 3', introns ou com a sequência codificadora. "RNA funcional" refere-se ao RNA *antisense*, RNA ribozima ou outro RNA que não pode ser traduzido, mas ainda tem um efeito nos processos celulares. Os termos "complemento" e "complemento reverso" são usados alternadamente no presente pedido com relação aos mRNA transcritos e se destinam a definir o RNA *antisense* do mensageiro.

O termo "ligado de maneira funcional" refere-se à associação de sequências de ácidos nucleicos em um fragmento único de ácido nucleico, de forma que a função de uma seja regulada pelo outra. Por exemplo, um promotor está ligado de maneira funcional a uma sequência codificadora, quando este é capaz de influenciar a expressão desta sequência codificadora (isto é, a sequência codificadora está sob o controle transcricional do promotor). Sequências codificadoras podem estar ligadas de maneira funcional às sequências reguladoras na orientação *sense* ou *antisense*. Em outro

exemplo, as regiões de complementaridade de RNA da invenção podem ser ligadas de maneira funcional, tanto diretamente como indiretamente, 5' ao mRNA alvo, ou 3' ao mRNA alvo, ou dentro do alvo mRNA, ou uma primeira região complementar está 5' e seu complemento está 3' para o mRNA alvo.

5 Técnicas padrão de DNA recombinante e de biologia molecular usadas no presente pedido são bem conhecidas na técnica e estão descritas de forma mais completa em Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989). Métodos de transformação são bem conhecidos para os
10 técnicos no assunto e estão descritos abaixo.

 "PCR" ou "reação em cadeia da polimerase" é uma técnica para a síntese de grandes quantidades de segmentos específicos de DNA e consiste em uma série de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Tipicamente, o DNA fita dupla é desnaturado por aquecimento, os dois
15 *primers* complementares aos limites 3' do segmento alvo são anelados em temperatura baixa e então estendidos em uma temperatura intermediária. Um conjunto destas três etapas consecutivas é denominado "ciclo".

 O termo "recombinante" refere-se a uma combinação artificial de dois segmentos separados de outra forma, por exemplo, por síntese química
20 ou por manipulação de segmentos isolados de ácidos nucleicos por técnicas de engenharia genética.

 Os termos "plasmídio", "vetor" e "cassete" referem-se a um elemento extracromossomal que frequentemente carrega genes que não são parte do metabolismo central da célula, e usualmente está na forma de
25 moléculas de DNA circular fita dupla. Tais elementos podem ser sequências de replicação autônomas, sequências de integração de genoma, sequências de nucleotídeos ou de fago, lineares ou circulares, de DNA ou RNA dupla fita ou simples, derivadas de qualquer fonte, em que várias sequências de

nucleotídeos foram recombinadas ou unidas em uma única construção capaz de introduzir um fragmento promotor e uma sequência de DNA para um produto do gene selecionado, junto com a sequência não traduzida 3' apropriada em uma célula. "Cassete de transformação" refere-se a um vetor
5 específico que contém um gene estranho e que possui elementos além do gene estranho, que facilitam a transformação de uma célula hospedeira específica. "Cassete de expressão" refere-se a um vetor específico que contém um gene estranho e possui elementos, além do gene estranho, que permitem aumentar a expressão desse gene em um hospedeiro estranho (isto
10 é, para um fragmento de ácido nucléico distinto, dentro do qual uma sequência de ácido nucléico ou fragmento pode se movida).

Os termos "constructo recombinante", "constructo de expressão", "constructo quimérico" e "constructo de DNA recombinante" são usados alternadamente no presente pedido. Um constructo recombinante compreende
15 uma combinação artificial de fragmentos de ácido nucléico, por exemplo, sequências reguladoras e codificadoras que não são encontradas juntas na natureza. Por exemplo, um constructo quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências codificadoras derivadas de diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências codificadoras derivadas da
20 mesma fonte, mas organizadas de uma maneira diferente daquela encontrada na natureza. Tal constructo pode ser usado por si só ou pode ser usado junto com um vetor. Se for usado um vetor, então a escolha do vetor é dependente do método que será usado para transformar células hospedeiras, como é bem conhecido pelos técnicos no assunto. Por exemplo, um vetor plasmídeo pode
25 ser usado. O técnico no assunto é bem consciente dos elementos genéticos que devem estar presentes no vetor para transformar, selecionar e propagar com sucesso as células hospedeiras, que compreendem qualquer fragmento de ácido nucléico isolado da invenção. O técnico no assunto reconhecerá que

eventos de transformação independente diferentes resultarão em níveis e padrões de expressão diferentes (Jones *et al.*, *EMBO J.* 4:2411-2418 (1985); De Almeida *et al.*, *Mol. Gen. Genetics* 218:7886 (1989)), e então que múltiplos eventos devem ser selecionados com o objetivo de obter linhagens que exibam
5 o nível de expressão e padrão desejados. Tal seleção pode ser efetuada pela análise Southern de DNA, análise Northern de expressão de mRNA, análise *immunoblotting* de expressão de proteínas, ou análise fenotípica, entre outras.

O termo “expressão”, como usado no presente, refere-se à produção de um produto final funcional (por exemplo, um mRNA ou uma
10 proteína, tanto precursores como maduros).

O termo “introduzido” significa fornecer um ácido nucléico (por exemplo, constructo de expressão) ou proteína para uma célula. Introduzido inclui referência à incorporação de um ácido nucléico dentro de uma célula eucarionte ou procarionte, onde o ácido nucléico pode ser incorporado no
15 genoma da célula e inclui referência ao fornecimento transitório de um ácido nucléico ou proteína para a célula. Introduzido inclui referência aos métodos de transformação estável ou transitória, bem como cruzamento sexual. Dessa forma, “introduzido” no contexto de inserção de um fragmento de ácido nucléico (por exemplo, um constructo de DNA recombinante) em uma célula, significa
20 “transfecção”, “transformação” ou “transdução” e refere-se à incorporação de um fragmento de ácido nucléico em uma célula eucarionte ou procarionte, onde o fragmento de ácido nucléico pode ser incorporado no genoma da célula (por exemplo, como DNA cromossomal, plasmidial, plastidial ou mitocondrial), convertido em um replicon autônomo ou expresso de modo transitório (como
25 mRNA transfectado).

Proteína “madura” refere-se a um polipeptídio processado pós-tradução (isto é, aquela em que quaisquer pré ou pró-peptídios presentes no produto de tradução primária tenham sido removidos). Proteína “precursora”

refere-se ao produto primário de tradução de mRNA (isto é, com pré e pró-peptídios ainda presentes) Pré e pró-peptídios podem ser, mas não se limitam aos sinais de localização intracelular.

“Transformação estável” refere-se à transferência de um
5 fragmento de ácido nucléico para um genoma de um organismo hospedeiro, incluindo tanto genoma nuclear como de organelas, resultando em herança geneticamente estável. Ao contrário, “transformação transitória” refere-se à transferência de um fragmento de ácido nucléico no núcleo, ou organela contendo DNA de um organismo hospedeiro, resultando na expressão gênica
10 sem integração ou herança estável. Organismos hospedeiros que contêm os fragmentos de ácido nucléico transformados são denominados organismos “transgênicos”.

Como usado no presente pedido, “transgênico” refere-se a uma planta ou uma célula que compreende em seu genoma um polinucleotídeo
15 heterólogo. Preferencialmente, o polinucleotídeo heterólogo está integrado de modo estável dentro do genoma, de forma que o polinucleotídeo possa ser transferido para sucessivas gerações. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado no genoma individualmente ou como parte de um constructo de DNA recombinante. Transgênico é usado no presente pedido para incluir qualquer
20 célula, linhagem celular, calo, tecido, planta ou parte de plantas, cujo genótipo destas tenha sido alterado pela presença de um ácido nucléico heterólogo, incluindo aqueles transgênicos inicialmente alterados, bem como aqueles criados por cruzamento sexual ou propagação assexuada a partir do transgênico inicial. O termo “transgênico”, como usado no presente pedido,
25 não inclui a alteração do genoma (cromossomal ou extra-cromossomal) por métodos de geração convencional de plantas ou por eventos que ocorram naturalmente, como fertilização cruzada aleatória, infecção viral não-recombinante, transformação bacteriana não-recombinante, transposição não-

recombinante ou mutação espontânea.

“Inibição antisense” refere-se à produção de RNAs transcritos *antisense* capazes de suprimir a expressão da proteína alvo. A “co-supressão” refere-se à produção de RNA *sense* de transcrição capaz de suprimir a expressão de genes idênticos ou estranhos substancialmente similares ou endógenos (patente US 5.231.020). Construções de co-supressão em plantas foram previamente designadas pelo foco na superexpressão de uma sequência de ácido nucléico que possui homologia para um mRNA endógeno na orientação *sense*, que resulta na redução de todos os RNAs que possuem homologia à sequência (Vaucheret *et al.*, *Plant J.* 16:651659 (1998); Gura, *Nature* 404:804808 (2000)). A eficiência geral deste fenômeno é baixa, e a extensão da redução de RNA é amplamente variável. Trabalhos mais recentes descreveram o uso de estruturas “grampo” que incorporam todo, ou parte de uma sequência que codifica mRNA em uma orientação complementar que resulta em uma estrutura “haste-alça” para o RNA expresso (Publicação PCT documento WO 99/53050, publicado em 21 de outubro de 1999; Publicação PCT documento WO 02/00904, publicado em 3 de janeiro de 2002). Isto aumenta a frequência de co-supressão nas plantas transgênicas recuperadas. Outra variação descreve o uso de sequências virais de plantas para dirigir a supressão ou “silenciar” as sequências próximas que codificam mRNA (Publicação PCT documento WO 98/36083, publicado em 20 de agosto de 1998). Ambos destes fenômenos de co-supressão não foram elucidados mecanicamente, embora evidências genéticas tenham sido iniciadas para solucionar esta situação complexa (Elmayan *et al.*, *Plant Cell* 10:1747-1757 (1998)).

O termo “oleaginoso” refere-se àqueles organismos que tendem a armazenar sua fonte de energia na forma de lipídeos (Weete, em: *Fungal Lipid Biochemistry*, 2ª edição., Plenum, 1980). Uma classe de plantas identificadas

como oleaginosas são comumente denominadas plantas com “sementes oleaginosas”. Exemplos de sementes oleaginosas incluem, mas não se limitam a: soja (*Glycine* e *Soja* sp.), linho (*Linum* sp.), semente de colza (*Brassica* sp.), milho, algodão, cártamo (*Carthamus* sp.) e girassol (*Helianthus* sp.).

5 Dentre os micro-organismos oleaginosos, conteúdo celular oleoso ou TAG segue uma curva sigmóide, em que a concentração de lipídeo aumenta até alcançar um máximo na fase de crescimento logarítmico final ou fase estacionária de crescimento e, então, diminui gradualmente durante a fase estacionária final e fase de morte (Yongmanitchai e Ward, *Appl. Environ. Microbiol.* 57:419-25 (1991)) O termo “levedura oleaginosa” refere-se àqueles
10 micro-organismos classificados como leveduras que produzem óleo. Para os micro-organismos oleaginosos não é incomum o acúmulo de óleo em excesso de cerca de 25% de seu peso celular seco como óleo. Exemplos de leveduras oleaginosas incluem, mas não se limitam aos seguintes gêneros: *Yarrowia*,
15 *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

 O termo "Euglenophyceae" refere-se a um grupo de flagelados unicelulares, incolores ou que realizam fotossíntese (euglenóides), encontrados em água doce, no mar, no solo ou em ambientes parasíticos.
20 A classe é caracterizada por organismos unicelulares solitários, sendo que a maioria é livre-natante e tem dois flagelos (um destes pode ser não emergente), que surgem a partir de uma invaginação anterior conhecida como um reservatório. Os euglenóides fotossintéticos contêm de um a muitos cloroplastos verdes, que variam de discos pequenos até placas
25 expandidas ou faixas. Os euglenóides incolores dependem da osmotrofia ou fagotrofia para assimilação de nutrientes. Cerca de 1000 espécies foram descritas e classificadas em cerca de 40 gêneros e 6 ordens. Exemplos de Euglenophyceae incluem, mas não se limitam aos seguintes

gêneros: *Euglena*, *Eutreptiella* e *Tetruetreptia*.

O termo “planta” refere-se às plantas inteiras, órgãos vegetais, tecidos vegetais, sementes, células vegetais e progênie das mesmas. Células vegetais incluem, sem limitação, células de sementes, culturas em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecidos do caule, folhas, raízes, ramos, gametófitos, esporófitos, pólen e microesporos.

“Progênie” compreende qualquer geração subsequente de uma planta.

UMA VISÃO GERAL: BIOSÍNTESE MICROBIANA DE ÁCIDOS GRAXOS E

TRIACILGLICERÓIS

Em geral, o acúmulo de lipídio em micro-organismos oleaginosos é acionado em resposta à proporção total de carbono e nitrogênio presentes no meio de crescimento. Este processo, que leva à nova síntese de palmitato livre (16:0) em micro-organismos oleaginosos, está descrito em detalhes na Publicação PCT documento WO 2004/101757. O palmitato é o precursor de derivados ácido graxo saturado de cadeia longa e insaturado e que são formados através da ação de elongases e desaturases (figura 1).

TAGs (a primeira unidade de armazenagem para ácidos graxos) são formados por uma série de reações que envolvem: (1) a esterificação de uma molécula de acil-CoA para glicerol-3-fosfato através de uma aciltransferase para produzir ácido lisofosfatídico; (2) a esterificação de uma segunda molécula de acil-CoA através de aciltransferase para produzir 1,2-diacilglicerol fosfato (comumente identificado como ácido fosfatídico); (3) remoção de um fosfato por ácido fosfatídico fosfatase para produzir 1,2-diacilglicerol (DAG); e (4) a adição de um terceiro ácido graxo pela ação de uma aciltransferase para formar TAG. Um amplo espectro de ácidos graxos pode ser incorporado nos TAGs, incluindo ácidos graxos saturados e insaturados e ácidos graxos de cadeia curta e longa.

BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA

O processo metabólico em que o ácido oléico é convertido para ácidos ômega-3/ômega-6 de cadeia longa envolve alongamento da cadeia de carbono através da adição de átomos de carbono e dessaturação da molécula através da adição de ligações duplas. Isto necessita de uma série de enzimas especiais para dessaturação e alongamento, presentes na membrana do retículo endoplasmático. No entanto, conforme visto na figura 1 e conforme descrito abaixo, há frequentemente vias alternativas para produção de um ácido graxo ômega-3/ômega 6 de cadeia longa específico.

Especificamente, todas as vias necessitam da conversão inicial de ácido oléico para LA, a primeira dos ácidos graxos ômega-6, por uma delta-12 desaturase. Então, usando-se a "via delta-9 elongase/delta-8 desaturase", são formados ácidos graxos ômega-6 de cadeia longa como segue: (1) LA é convertido para EDA por uma delta-9 elongase; (2) EDA é convertido para DGLA por uma delta-8 desaturase; e (3) DGLA é convertido para ARA por uma delta-5 desaturase. Alternativamente, a "via delta-9 elongase/delta-8 desaturase", pode ser utilizada para a formação de ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa como a segue: (1) LA é convertido para ALA, o primeiro dos ácidos graxos ômega-3, por uma delta-15 desaturase; (2) ALA é convertido para ETrA por uma delta-9 elongase; (3) ETrA é convertido para ETA por uma delta-8 desaturase; (4) ETA é convertido para EPA por uma delta-5 desaturase; (5) EPA é convertido para DPA por uma C_{20/22} elongase; e (6) DPA é convertido para DHA por uma delta-4 desaturase. Opcionalmente, ácidos graxos ômega-6 podem ser convertidos para ácidos graxos ômega-3, por exemplo, ETA e EPA são produzidos a partir de DGLA e ARA, respectivamente, por uma atividade de delta-17 desaturase.

Vias alternativas para a biossíntese de ácidos graxos ômega-3/ômega-6, utilizam uma delta-6 desaturase e elongase C_{18/20} (também

conhecida como delta-6 elongase, os termos podem ser usados alternadamente) (isto é, a via “delta-6 desaturase/delta-6 elongase”). Mais especificamente, LA e ALA podem ser convertidos para GLA e STA, respectivamente, por uma delta-6 desaturase, então, uma elongase C_{18/20} 5 converte GLA para DGLA e/ou STA para ETA.

Está contemplado que as funcionalidades particulares necessárias para ser introduzido dentro de um organismo para produção de ácidos graxos ômega-3/ômega-6 dependerá do organismo hospedeiro (e seu perfil de PUFA nativo e/ou perfil de elongase), a 10 disponibilidade de substrato e do(s) produto(s) final(is) desejado(s). Por exemplo, a expressão da via delta-9 elongase/delta-8 desaturase pode ser preferida em algumas realizações, em oposição à expressão da via delta-6 desaturase/delta-6 elongase, visto que PUFAs produzidos através da via original são destituídos de GLA.

15 Um técnico no assunto será capaz de identificar vários genes candidatos que codificam cada uma das enzimas desejadas para a biossíntese de ácidos graxos ômega-3/ômega-6. As sequências de desaturase e elongase úteis podem ser derivadas de qualquer fonte, por exemplo, isoladas a partir de uma fonte natural (de bactérias, algas, fungos, plantas, animais, etc.), 20 produzidas através de uma rota semissintética ou sintetizadas novamente. Embora a fonte específica dos genes da desaturase e da elongase introduzidos no organismo hospedeiro não seja importante, considerações para a escolha de um polipeptídeo específico tendo atividade de desaturase ou elongase inclui: (1) a especificidade de substrato do polipeptídeo; (2) se o polipeptídeo 25 ou um componente deste é uma enzima limitante de taxa; (3) se a desaturase ou a elongase é essencial para a síntese de um PUFA desejado; e/ou (4) cofatores necessários para o polipeptídeo. O polipeptídeo expresso preferencialmente possui parâmetros compatíveis com o ambiente bioquímico

de sua localização na célula hospedeira (consulte Publicação PCT documento WO 2004/101757 para detalhes adicionais).

Em realizações adicionais, também será útil considerar a eficiência de conversão de cada desaturase e/ou elongase específica. Mais especificamente, visto que cada enzima raramente funciona com 100% de eficiência para converter um substrato em produto, o perfil lipídico final de óleos não purificados em uma célula hospedeira será tipicamente uma mistura de vários PUFAs consistindo em ácido graxo ômega-3/ômega-6, bem como vários intermediários de PUFAs a montante. Dessa forma, a consideração de cada eficiência de conversão da enzima também é uma variável na otimização da biossíntese de um ácido graxo desejado que precisa ser considerada na luz do perfil lipídico final desejado do produto.

Com cada uma das considerações acima em mente, os genes candidatos tendo as atividades apropriadas de desaturasas e elongase (por exemplo, delta-6 desaturasas, elongases C_{18/20}, delta-5 desaturasas, delta-17 desaturasas, delta-15 desaturasas, delta-9 desaturasas, delta-12 desaturasas, elongases C_{14/16}, elongases C_{16/18}, delta-9 elongases, delta-8 desaturasas, delta-4 desaturasas e elongases C_{20/22}) podem ser identificados de acordo com a literatura publicamente disponível (por exemplo, GenBank), na literatura de patente e análise experimental de organismos tendo a capacidade de produzir PUFAs. Estes genes serão adequados para introdução em um organismo específico, para permitir ou aumentar a síntese de PUFAs do organismo.

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE NOVAS DELTA-8 DESATURASES

Na presente invenção, sequências de nucleotídeos que codificam delta-8 desaturasas foram isoladas a partir de *Euglena anabaena* (designada no presente pedido como "EaD8Des1", "EaD8Des2", "EaD8Des3" e "EaD8Des4").

A presente invenção refere-se a um polinucleotídeo isolado que

compreende:

- (a) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que o polipeptídeo tem pelo menos 80% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação a uma sequência de aminoácido conforme apresentada na SEQ ID NO:21 [EaD8Des1], SEQ ID NO:22 [EaD8Des2], SEQ ID NO:23 [EaD8Des3] ou SEQ ID NO:24 [EaD8Des4];
- (b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que a sequência de nucleotídeos tem pelo menos 80% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento BLASTN, em comparação a uma sequência de nucleotídeos conforme apresentada na ID NO:17 [EaD8Des1], SEQ ID NO:18 [EaD8Des2], SEQ ID NO:19 [EaD8Des3] ou SEQ ID NO:20 [EaD8Des4]; ou,
- (c) um complemento da sequência de nucleotídeo de (a) ou (b), sendo que o complemento e a sequência de nucleotídeos consistem no mesmo número de nucleotídeos e são 100% complementares.

Em ainda outro aspecto, a invenção refere-se a um polinucleotídeo isolado que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que a sequência de nucleotídeo tem pelo menos 90% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento BLASTN, em comparação a uma sequência de nucleotídeo conforme apresentada na SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 ou SEQ ID NO:20.

Em realizações alternativas, as presentes sequências de desaturases EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 or EaD8Des4 podem ter otimização de códon para expressão em um organismo hospedeiro específico. Como é bem conhecido na técnica, este pode ser um meio útil para, ainda, otimizar a expressão da enzima no hospedeiro alternativo, visto que o uso de

códons preferidos pelo hospedeiro pode substancialmente aumentar a expressão do gene estranho que codifica o polipeptídeo. Em geral, códons preferidos pelos hospedeiros podem ser determinados dentro de uma espécie específica de hospedeiro de interesse pela análise do uso de códon nas proteínas (preferencialmente aquelas expressas em grandes quantidades) e determinando quais códons são usados com frequência mais alta. Então, a sequência codificadora para um polipeptídeo de interesse tendo atividade de desaturase pode ser sintetizada por completo ou em partes, usando-se os códons preferidos pelas espécies hospedeiras.

Em uma realização da invenção da presente invenção, EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 e/ou EaD8Des4 poderiam ter otimização de códon para expressão em *Yarrowia lipolytica*, como ensinado na Publicação PCT documento WO 04/101757 e patente US 7.125.672. Em realizações alternativas, pode ser desejável modificar uma porção dos códons que codificam EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 e/ou EaD8Des4 (conforme apresentado nas SEQ ID NOs:17, 18, 19 e 20, respectivamente, para aumentar a expressão do gene em um organismo hospedeiro, incluindo mas não se limitando a, uma planta ou parte de plantas.

Um técnico no assunto seria capaz de usar os ensinamentos no presente pedido para criar várias outras proteínas delta-8 desaturase com otimização de códon, adequadas para a máxima expressão em hospedeiros alternativos, com base nas sequências EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 e/ou EaD8Des4 tipo selvagem. Consequentemente, a presente invenção refere-se a qualquer proteína delta-8 desaturase com otimização de códon que seja derivada a partir de EaD8Des1 tipo selvagem (isto é, codificada pela SEQ ID NO:17), EaD8Des2 tipo selvagem (isto é, codificada pela SEQ ID NO:18), EaD8Des3 tipo selvagem (isto é, codificada pela SEQ ID NO:19) ou EaD8Des4 tipo selvagem (isto é, codificada pela SEQ ID NO:20)

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE HOMÓLOGOS

Qualquer uma das sequências de desaturases (isto é, EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 ou EaD8Des4), ou porções destas, podem ser usadas para a busca da delta-8 desaturase homóloga na mesma espécie ou em outra
5 espécie de bactéria, alga, fungo, euglenóide ou planta, usando-se um programa de análise de sequência. Em geral, tal programa de computação compara sequências similares pela designação de graus de homologia de várias substituições, deleções e outras modificações.

Alternativamente, qualquer uma das sequências de desaturase ou
10 porções destas também podem ser empregadas como reagentes de hibridização para a identificação de homólogos de delta-8 desaturase. Os componentes básicos de um teste de hibridização de ácido nucléico incluem uma sonda, uma amostra com suspeita de conter o gene ou fragmento do gene de interesse e um método específico de hibridização. As sondas da presente
15 invenção são tipicamente sequências de ácido nucléico de fita simples, complementares às sequências de ácido nucléico a serem detectadas. As sondas são “hibridizáveis” à sequência de ácido nucléico a ser detectada. Embora o comprimento da sonda possa variar de 5 bases até dezenas de milhares de bases, tipicamente, é adequado um comprimento de sonda de
20 cerca de 15 bases até cerca de 30 bases. Apenas parte da molécula da sonda precisa ser complementar à sequência de ácido nucléico a ser detectada. Além disso, a complementaridade entre a sonda e a sequência alvo não precisa ser perfeita. A hibridização também pode ocorrer entre as moléculas complementares de maneira imperfeita, resultando em certa fração das bases
25 na região hibridizada não pareadas com a base complementar apropriada.

Os métodos para hibridização são bem definidos. Tipicamente a sonda e a amostra devem ser misturadas mediante condições que permitam a hibridização do ácido nucléico. Isto envolve colocar a sonda e a amostra em

contato com um sal inorgânico ou orgânico mediante condições de temperatura e concentração apropriadas. A sonda e a amostra de ácidos nucleicos devem ficar em contato por tempo suficiente para que qualquer possível hibridização entre a sonda e a amostra de ácido nucleico possa ocorrer. A concentração da sonda ou do alvo na mistura determinará o tempo necessário para que a hibridização ocorra. Quanto maior a concentração da sonda ou do alvo, menor o tempo de incubação necessário. Opcionalmente, um agente caotrópico pode ser adicionado (por exemplo, cloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, tiocianato de sódio, tetracloroacetato de lítio, perclorato de sódio, tetracloroacetato de rubídio, iodeto de potássio, trifluoroacetato de célio). Se desejado, pode-se adicionar formamida à mistura de hibridização, tipicamente 30 a 50% (v/v).

Várias soluções de hibridização podem ser empregadas. Tipicamente, estas compreendem de cerca de 20% a 60% do volume, preferencialmente 30% de um solvente polar orgânico. Uma solução de hibridização comum emprega cerca de 30% a 50% v/v de formamida, cloreto de sódio a cerca de 0,15 M a 1 M, tampões a cerca de 0,05 M a 0,1 M (por exemplo, citrato de sódio, Tris-HCl, PIPES ou HEPES (pH na faixa de 6 a 9)), cerca de 0,05% a 0,2% de detergente (por exemplo, dodecilsulfato de sódio), ou EDTA entre 0,5 a 20 mM, FICOLL (Pharmacia Inc.) (cerca de 300 a 500 kdal), polivinilpirrolidona (cerca de 250 a 500 kdal), e albumina do soro. Também será incluído na solução de hibridização típica um carreador de ácidos nucleicos não marcado de cerca de 0,1 a 5 mg/ml, DNA nucleico fragmentado (por exemplo, do timo de bezerro ou DNA de esperma de salmão, ou RNA de levedura), e opcionalmente de cerca de 0,5% a 2% de glicina peso/vol. Outras atividades também podem estar incluídas, como agentes de exclusão de volume que incluem uma variedade de agentes solúveis em água ou agentes de expansão (por exemplo, polietilenoglicol) e polímeros

sacarídicos aniônicos (por exemplo, sulfato de dextrano).

A hibridização de ácido nucléico é adaptável a uma variedade de formatos de testes. Um dos mais adequados é o formato de teste sanduíche. O teste sanduíche é particularmente adaptável para a hibridização mediante
5 condições não desnaturantes. Um componente principal de um teste sanduíche é um suporte sólido. O suporte sólido adsorveu ou se acoplou covalentemente à sonda de ácido nucléico imobilizado, não marcada e complementar a uma porção da sequência.

Em realizações adicionais, quaisquer fragmentos de ácidos
10 nucléicos de delta-8 desaturase descritos no presente pedido (ou quaisquer homólogos destes identificados) podem ser usados para isolar os genes que codificam proteínas homólogas a partir da mesma ou de outra espécie de bactéria, alga, fungo, euglenóide ou planta. O isolamento de genes homólogos usando-se protocolos dependentes de sequência é bem conhecido na técnica.
15 Exemplos de protocolos dependentes de sequência incluem, mas não se limitam a: (1) métodos de hibridização de ácido nucléico; (2) métodos de amplificação de DNA e RNA, conforme exemplificado por vários usos de tecnologias de amplificação de ácido nucléico (por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR), Mullis *et al.*, patente US 4.683.202; reação em cadeia da
20 ligase (LCR), Tabor *et al.*, *Proc. Acad. Sci. USA* 82:1074 (1985); ou amplificação por deslocamento de fita (SDA), Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:392 (1992)); e (3) métodos para construção e seleção de bibliotecas para complementação.

Por exemplo, genes que codificam proteínas ou polipeptídeos
25 para delta-8 desaturases, descritos no presente pedido, poderiam ser isolados diretamente pelo uso de todo ou de uma porção dos presentes fragmentos de ácido nucléico como sondas de hibridização de DNA para selecionar bibliotecas a partir de, por exemplo, qualquer levedura ou fungo desejado,

usando-se a metodologia bem conhecida pelos técnicos no assunto (sendo que os organismos que produzem DGLA e/ou ETA seriam preferenciais). Sondas de oligonucleotídeos específicas baseadas nas presentes sequências de ácidos nucléicos podem ser projetadas e sintetizadas por métodos conhecidos na técnica (Maniatis, acima). Além disso, as sequências inteiras podem ser usadas diretamente para sintetizar sondas de DNA pelos métodos conhecidos pelo técnico no assunto (por exemplo, *primers* aleatórios de DNA marcados, tradução cortada, ou técnicas de marcação de terminação), ou uso de sondas de RNA disponíveis em sistemas de transcrição *in vitro*. Além disso, *primers* específicos podem ser projetados e usados para amplificar uma parte ou as presentes sequências inteiras. Os produtos de amplificação resultantes podem ser marcados diretamente durante as reações de amplificação ou marcados após a amplificação, e usados como sondas para isolar os fragmentos de DNA inteiros mediante condições apropriadas de estrigência.

Tipicamente, nas técnicas de amplificação tipo PCR, os *primers* têm diferentes sequências e não são complementares entre si. Dependendo das condições de teste desejadas, as sequências dos *primers* poderiam ser projetadas para fornecer replicação eficiente e confiável do ácido nucléico alvo. Métodos de projeto de *primer* de PCR são comuns e bem conhecidos na técnica (Thein e Wallace, "The use of oligonucleotide as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders", em *Human Genetic Diseases: A Practical Approach*, K. E. Davis Ed., (1986) páginas 33 a 50, IRL: Herndon, VA; e Rychlik, W., em *Methods in Molecular Biology*, White, B. A. Ed., (1993) Volume 15, páginas 31 a 39, PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humana: Totowa, NJ).

Geralmente dois segmentos curtos das presentes sequências podem ser úteis para serem usados nos protocolos de PCR para amplificar fragmentos de ácidos nucléicos que codificam genes homólogos do DNA ou

RNA. PCR também pode ser realizado sobre uma biblioteca de fragmentos clonados de ácido nucléico, em que a sequência de um *primer* é derivada dos presentes fragmentos de ácido nucléico, e a sequência do outro *primer* aproveita a presença da área de ácido poliadenílico na extremidade 3' do mRNA precursor que codifica os genes eucariontes.

Alternativamente, a segunda sequência de *primer* pode estar baseada nas sequências derivadas do vetor de clonagem. Por exemplo, o técnico no assunto pode seguir o protocolo RACE (Frohman *et al.*, PNAS USA 85:8998 (1988)) para gerar cDNAs pelo uso de PCR para amplificar cópias da região entre um único ponto no transcrito e na extremidade 3' ou 5'. Os *primers* orientados nas direções 3' e 5' podem ser designados a partir das presentes sequências. Usando-se os sistemas 3' RACE ou 5' RACE disponíveis comercialmente (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), fragmentos de cDNA 3' ou 5' específicos podem ser isolados (Ohara *et al.*, PNAS USA 86:5673 (1989); Loh *et al.*, *Science* 243:217 (1989)).

Em outras realizações, qualquer um dos fragmentos de ácido nucléico de delta-8 desaturase descritos no presente pedido (ou qualquer homólogo destes identificados) podem ser usados para a criação de novas e aprimoradas desaturases de ácidos graxos. Como é bem conhecido na técnica, mutagênese e seleção *in vitro*, mutagênese química, métodos de “mistura de genes”, ou outros meios, podem ser empregados para se obter mutações de genes de desaturase que ocorrem naturalmente. Alternativamente, ácidos graxos aprimorados podem ser sintetizados pelo domínio de troca, em que um domínio funcional de qualquer fragmento de ácido nucléico de delta-8 desaturase no presente pedido é trocado por um domínio funcional em um gene de desaturase alternativo, para resultar, através disso, em uma nova proteína. Como usado no presente pedido, “domínio” ou “domínio funcional” refere-se à(s) sequência(s) de ácido nucléico que é(são)

capaz(es) de obter uma resposta biológica em plantas.

MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE VÁRIOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E/OU ÔMEGA-6

Espera-se que a introdução de genes quiméricos que codificam as delta-8 desaturases descritas no presente pedido (isto é, EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3, EaD8Des4 ou outras enzimas mutantes, enzimas com otimização de códon ou homólogas destas), mediante o controle dos promotores apropriados resulte no aumento de produção de DGLA e/ou ETA no organismo hospedeiro transformado, respectivamente. Como tal, a presente invenção engloba um método para produção direta de PUFAs, que compreende expor um substrato de ácido graxo (isto é, EDA e/ou ETrA) às enzimas desaturases descritas no presente pedido (por exemplo, EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 ou EaD8Des4) de modo que o substrato seja convertido para o produto ácido graxo desejado (isto é, DGLA e/ou ETA).

Mais especificamente, é objeto da presente invenção fornecer um método para a produção de DGLA em uma célula hospedeira (por exemplo, oleaginosa, levedura, soja), sendo que a célula hospedeira compreende:

(a) um constructo recombinante que codifica um polipeptídeo delta-8 desaturase selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24; e,

(b) uma fonte de EDA;

sendo que a célula hospedeira é cultivada mediante condições em que a delta-8 desaturase é expressa e EDA é convertido para DGLA, e sendo que DGLA é opcionalmente recuperado.

Em realizações alternativas da presente invenção, a delta-8 desaturase pode ser usada para a conversão de ETrA para ETA. Consequentemente, a invenção fornece um método para a produção de ETA, sendo que a célula hospedeira compreende:

(a) um constructo recombinante que codifica um polipeptídeo

delta-8 desaturase selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24; e,

(b) uma fonte de ETrA;

sendo que a célula hospedeira é cultivada mediante condições em que a delta-8 desaturase é expressa e ETrA é convertido para ETA, e sendo que ETA é opcionalmente recuperado.

Alternativamente, cada gene para delta-8 desaturase e seu produto enzima correspondente descrito no presente pedido pode ser usado indiretamente para a produção de vários PUFAs ômega-6 e ômega-3, incluindo, por exemplo, DGLA, ETA, ARA, EPA, DPA e/ou DHA (consulte figura 1; consulte também publicação PCT documento WO 2004/101757). A produção indireta dos PUFAs ômega-3/ômega-6 ocorre onde o substrato ácido graxo é convertido indiretamente no produto ácido graxo desejado, através de etapa(s) intermediária(s) ou via(s) intermediária(s). Dessa forma, está contemplado que as delta-8 desaturasas descritas no presente pedido (isto é, EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3, EaD8Des4, ou outras enzimas mutantes, enzimas com otimização de códon ou homólogas destas) podem ser expressas junto com genes adicionais que codificam a via biossintética de PUFA (por exemplo, delta-6 desaturasas, elongases C18/20, delta-17 desaturasas, delta-8 desaturasas, delta-15 desaturasas, delta-9 desaturasas, delta-12 desaturasas, elongases C14/16, elongases C16/18, delta-9 elongases, delta-5 desaturasas, delta-4 desaturasas, elongases C20/22) para resultar em níveis mais altos de produção de ácidos graxos ômega-3/ômega-6 com cadeias mais longas (por exemplo, ARA, EPA, DPA e DHA).

Em realizações preferenciais, as delta-8 desaturasas da presente invenção serão expressas de forma mínima, em conjunto com uma delta-9 elongase (por exemplo, uma delta-9 elongase ou uma uma delta-9 elongase com otimização de códon). No entanto, os genes específicos incluídos dentro

de um cassete de expressão dependerão da célula hospedeira (e de seu perfil de PUFA e/ou perfil de desaturase/elongase), da disponibilidade do substrato e do(s) produto(s) final(is) desejado(s).

Eventualmente, pode ser desejável minimizar subprodutos de ácidos graxos. A abundância relativa de subprodutos de ácidos graxos poderia ser reduzida pelo aumento total da atividade de delta-8 desaturase. Uma abordagem para minimizar subprodutos de ácidos graxos seria expressar mais de uma delta-8 desaturase (isto é, uma delta-8 desaturase igual ou diferente). Por exemplo, a presença de ácido sciadônico (SCI) e/ou ácido juniperônico (JUP) (comumente encontrado nos lipídeos das sementes de gimnospermas (Wolff *et al.*, *Lipids* 35 (1) 1-22 (2000)), como aqueles na família *Pinaceae* (pinha)) poderiam ser considerados subprodutos de ácidos graxos de uma via delta-6 desaturase/delta-6 elongase ou via delta-9-elongase/delta-8 desaturase. Embora estes ácidos sejam considerados como tendo várias propriedades para melhora da saúde (Nakane *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 23: 758-761 (2000)), a presença deles como subproduto de ácidos graxos em uma via PUFA elaborada geneticamente, como em um safrão de semente oleaginosa, pode não ser desejável dependendo da aplicação.

O termo "via delta-6 desaturase/delta-6 elongase" também se refere a uma via biossintética para produção de PUFA de cadeia longa. Esta via, no mínimo, compreende uma delta-6 desaturase e uma delta-6 elongase, por meio disso, permitindo a biossíntese de DGLA e/ou ETA a partir de LA e ALA, respectivamente. Com a expressão de outras desaturasas e elongases, ARA, EPA, DPA e DHA também podem ser sintetizados. Ocasionalmente, uma delta-6 elongase pode alongar ácidos graxos além dos ácidos graxos pretendidos. Por exemplo, geralmente delta-6 elongases convertem GLA para DGLA, mas algumas delta-6 elongases podem, também, converter substratos não pretendidos, como LA ou ALA para EDA ou ETrA, respectivamente. Em

uma via delta-6 desaturase/delta-6 elongase, EDA e ETrA seriam considerados "subprodutos de ácidos graxos", conforme definido abaixo. Em adição a uma delta-8 desaturase para uma via delta-6 desaturase/delta-6 elongase seria fornecido um meio para converter "subprodutos de ácidos graxo" EDA e ETrA
 5 de volta para os "ácidos graxos intermediários" (conforme definido anteriormente) DGLA e ETA, respectivamente.

SISTEMAS DE EXPRESSÃO EM PLANTAS, CASSETES E VETORES, E TRANSFORMAÇÃO

Em uma realização, esta invenção refere-se a um constructo recombinante que compreende qualquer um dos polinucleotídeos de delta-8
 10 desaturase da invenção, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora para expressão em uma planta. Um promotor é uma sequência de DNA que direciona a maquinaria celular de uma planta para produzir RNA a partir da sequência codificadora adjacente a jusante (3') do promotor. A região promotora influencia a taxa, estágio de desenvolvimento e
 15 tipo celular nos quais o RNA transcrito do gene é fabricado. O RNA transcrito é processado para produzir mRNA que serve como um molde para a tradução da sequência de RNA para a sequência de aminoácido do polipeptídeo codificado. A sequência líder não traduzida 5' é uma região do mRNA a montante da região codificadora da proteína que pode atuar na iniciação e tradução do
 20 mRNA. A terminação de transcrição 3'/sinal de poliadenilação é uma região não traduzida a jusante da região codificadora da proteína que funciona na célula vegetal para induzir a terminação do RNA transcrito e a adição de nucleotídeos poliadenilados à extremidade 3'do RNA.

A origem do promotor escolhido para direcionar a expressão da
 25 sequência codificadora da delta-8 desaturase não é importante se esta possuir atividade transcricional suficiente para realizar a invenção pela expressão do mRNA traduzível para os fragmentos de ácido nucléico desejados no tecido hospedeiro desejado, no momento certo. Tanto promotores homólogos como

heterólogos (isto é, endógenos) podem ser usados para praticar a invenção. Por exemplo, promotores adequados incluem, mas não se limitam a: subunidade alfa prime do promotor beta conglucina, promotor 3 Kunitz inibidor de tripsina, promotor anexina, promotor Gy1, subunidade beta do promotor beta conglucina, promotor P34/Gly Bdm 30K, promotor albumina, promotor Leg A1 e promotor Leg A2.

O promotor anexina, ou P34, está descrito na Publicação PCR documento WO 2004/071178 (publicado em 26 de agosto de 2004). O nível de atividade do promotor anexina é comparável àquele de muitos promotores fortes conhecidos, como: (1) o promotor CaMV 35S (Atanassova *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 37:275-285 (1998); Battraw e Hall, *Plant Mol. Biol.* 15:527-538 (1990); Holtorf *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 29:637-646 (1995); Jefferson *et al.*, *EMBO J.* 6:3901-3907 (1987); Wilmink *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 28:949-955 (1995)); (2) promotores oleosina de *Arabidopsis* (Plant *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 25:193-205 (1994); Li, Texas A&M University dissertação de Ph.D., páginas 107-128 (1997)); (3) os promotores de proteína de extensão de ubiquitina *Arabidopsis* (Callis *et al.*, *J Biol. Chem.* 265(21):12486-93 (1990)); (4) um promotor do gene de ubiquitina de tomate (Rollfinke *et al.*, *Gene.* 211(2):267-76 (1998)); (5) um promotor de choque térmico de soja (Schoffl *et al.*, *Mol Gen Genet.* 217(2-3):246-53 (1989)); e (6) um promotor do gene de histona H3 de milho (Atanassova *et al.*, *Plant Mol Biol.* 37(2):275-85 (1989)).

Outra característica útil do promotor anexina é seu perfil de expressão no desenvolvimento de sementes. O promotor anexina é mais ativo em sementes em desenvolvimento nos estágios iniciais (antes dos 10 dias após a polinização) e é amplamente quiescente nos estágios tardios. O perfil de expressão do promotor anexina é diferente daquele de muitos promotores específicos de sementes, por exemplo, promotores de armazenamento de proteína na semente, que frequentemente fornecem atividades mais altas nos

estágios tardios do desenvolvimento (Chen *et al.*, *Dev. Genet.* 10:112-122,(1989); Ellerstrom *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027 (1996); Keddie *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 24:327-340 (1994); *Plant et al.*, (acima); Li, (acima)). O promotor anexina possui um perfil de expressão mais convencional, mas
 5 permanece diferente de outros promotores específicos conhecidos de sementes. Dessa forma, o promotor anexina será um candidato atraente quando a superexpressão ou supressão de um gene no embrião é desejada em um estágio inicial do desenvolvimento. Por exemplo, pode ser desejável superexpressar um gene que regula o desenvolvimento embrionário inicial ou
 10 um gene envolvido no metabolismo anterior à maturação da semente.

Após a identificação de um promotor adequado para expressão de uma sequência codificadora delta-8 desaturase específica, o promotor é então ligado de maneira funcional na orientação *sense* usando-se meios convencionais bem conhecidos pelos técnicos no assunto.

15 Técnicas padrão de DNA recombinante e de biologia molecular usadas no presente pedido são bem conhecidas na técnica e estão descritas de forma mais completa em Sambrook, J. *et al.*, em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2ª edição; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nova York, 1989 (deste ponto em diante do presente pedido
 20 "Sambrook *et al.*, 1989") ou Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K., Eds.; em *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley and Sons: Nova York, 1990 (deste ponto em diante do presente pedido "Ausubel *et al.*, 1990").

Uma vez que a construção recombinante tenha sido feita, pode-se
 25 então introduzi-la em uma célula vegetal de escolha, por métodos bem conhecidos pelos técnicos no assunto (por exemplo, transfecção, transformação e eletroporação). Células vegetais oleaginosas são as células vegetais preferenciais. A célula vegetal transformada é então cultivada e

regenerada mediante condições adequadas que permitam a expressão de PUFA de cadeia longa que é, então, opcionalmente recuperado e purificado.

Os constructos recombinantes da invenção podem ser introduzidos em uma célula vegetal ou, alternativamente, cada constructo pode ser introduzido em células vegetais separadas.

A expressão em uma célula vegetal pode ser realizada de uma maneira transitória ou estável, conforme descrito acima.

Os PUFA de cadeia longa desejados podem ser expressos na semente. Estão também dentro do escopo desta invenção, as sementes ou partes de plantas obtidas a partir de tais plantas transformadas.

Partes de plantas incluem tecidos diferenciados e não diferenciados incluindo, mas não se limitando aos seguintes: raízes, caules, ramos, folhas, pólen, sementes, tecidos tumorais e várias formas celulares e de cultura (por exemplo, células individuais, protoplastos, embriões e tecidos do caule). O tecido vegetal pode estar na planta ou em um órgão da planta, tecido ou cultura celular.

O termo “órgão da planta” refere-se ao tecido vegetal ou grupo de tecidos que constituem uma parte de uma planta, diferente morfológica e funcionalmente. O termo “genoma” refere-se ao seguinte: (1) o complemento completo de material genético (genes e sequências não codificadoras) que está presente em cada célula de um organismo, ou vírus ou organela; (2) um conjunto completo de cromossomos herdados como uma unidade (haplóide) a partir de um parental.

Dessa forma, esta invenção também se refere a um método para transformar uma célula, que compreende transformar uma célula com o constructo recombinante da invenção e selecionar essas células transformadas com o constructo recombinante da reivindicação 8.

É também de interesse um método para produzir uma planta

transformada que compreende transformar uma célula vegetal com os polinucleotídeos de delta-8 desaturase da presente invenção, e regenerar uma planta a partir da célula vegetal transformada.

Métodos para transformar dicotiledôneas (principalmente pelo uso de *Agrobacterium tumefaciens*) e obter plantas transgênicas foram publicados, entre outros, para: algodão (patente US 5.004.863, patente US 5.159.135); soja (patente US 5.569.834, patente US 5.416.011); *Brassica* (patente US 5.463.174); amendoim (Cheng et al. *Plant Cell Rep.* 15:653-657 (1996); McKently et al. *Plant Cell Rep.* 14:699-703 (1995)); papaya (Ling, K. et al. *Bio/technology* 9:752-758 (1991)); e ervilha (Grant et al. *Plant Cell Rep.* 15:254-258 (1995)). Para uma revisão de outros métodos de transformação de planta comumente utilizados consulte Newell, C.A. (*Mol. Biotechnol.* 16:53-65 (2000)). Um destes métodos de transformação utiliza *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfler, M. e Casse-Delbart, F. *Microbiol. Sci.* 4:24-28 (1987)). A transformação de soja usando entrega direta de DNA foi publicada usando-se fusão PEG (publicação PCT documento WO 92/17598), eletroporação (Chowrira, G.M. et al. *Mol. Biotechnol.* 3:1723 (1995); Christou, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:3962-3966 (1987)), microinjeção e bombardeamento de partículas (McCabe, D.E. et al. *Bio/Technology* 6:923 (1988); Christou et al. *Plant Physiol.* 87:671-674 (1988)).

Existem vários métodos para a regeneração de plantas a partir de tecidos vegetais. O método específico de regeneração dependerá do tecido vegetal inicial e da espécie de planta a ser regenerada. A regeneração, o desenvolvimento e o cultivo de plantas a partir da transformação de protoplastos de uma única planta ou a partir de vários explantes, são bem conhecidos na técnica (Weissbach e Weissbach, em: *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), Academic: San Diego, CA (1988)). Este processo de regeneração e crescimento tipicamente inclui as etapas de seleção de células

transformadas e cultivo dessas células individualizadas através de estágios usuais do desenvolvimento embrionário através do estágio de plântula enraizada. Embriões transgênicos e sementes são regenerados de maneira similar. Os ramos enraizados transgênicos resultantes são posteriormente

5 plantados em um meio de crescimento vegetal apropriado, como solo. Preferencialmente, as plantas regeneradas são autopolinizadas para fornecer plantas transgênicas homozigotas. De outra forma, o pólen obtido a partir das plantas regeneradas é utilizado para o cruzamento com plantas desenvolvidas por sementes de linhagens importantes do ponto de vista agrônômico.

10 Reciprocamente, o pólen das plantas destas linhagens importantes é usado para polinizar plantas regeneradas. Uma planta transgênica da presente invenção que contém um polipeptídeo desejado é cultivada usando-se métodos conhecidos pelos técnicos no assunto.

Além dos procedimentos discutidos acima, os técnicos no assunto

15 estão familiarizados com recursos materiais padrão que descrevem condições específicas e procedimentos para: a construção, manipulação e isolamento de macromoléculas (por exemplo, moléculas de DNA, plasmídios, etc.), geração de fragmentos de DNA recombinante e constructos de expressão recombinante e a seleção e isolamento de clones. Consulte, por exemplo: Sambrook *et al.*,

20 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor: NY (1989); Maliga *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor: NY (1995); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Detecting Genes*, Volume 1, Cold Spring Harbor: NY (1998); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Analyzing DNA*, Volume 2, Cold Spring Harbor: NY (1998); *Plant Molecular Biology: A*

25 *Laboratory Manual*, eds. Clark, Springer: NY (1997).

Exemplos de sementes oleaginosas incluem, mas não se limitam a: soja, espécies de *Brassica*, girassol, milho, algodão, linho e cártamo.

Exemplos de PUFA's que têm pelo menos vinte átomos de

carbono e cinco ou mais ligações duplas carbono-carbono incluem, mas não se limitam a, ácidos graxos ômega-3 como EPA, DPA e DHA. Sementes obtidas de tais plantas também estão dentro do escopo desta invenção, bem como o óleo obtido a partir de tais sementes.

5 Dessa forma, em uma realização, esta invenção refere-se a uma semente oleaginosa que compreende:

 (a) um primeiro constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e,

10

 (b) pelo menos um constructo de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em uma delta-4 desaturase, uma delta-5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17 desaturase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e uma elongase C_{20/22}.

15

 Tais desaturases adicionais são discutidas, por exemplo, nas patentes US 6.075.183, 5.968.809, 6.136.574, 5.972.664, 6.051.754, 6.410.288 e publicações PCT documento WO 98/46763, documento WO 98/46764, documento WO 00/12720 e documento WO 00/40705.

20

 A escolha da combinação de cassetes usados depende em parte do perfil de PUFA e/ou do perfil de desaturase/elongase das células vegetais oleaginosas a serem transformadas, e do PUFA de cadeia longa que será expresso.

25

 Em outro aspecto, esta invenção refere-se a um método para fabricar PUFAs de cadeia longa em uma célula vegetal que compreende:

(a) transformar uma célula com o constructo recombinante da invenção; e

(b) selecionar essas células transformadas que produzem PUFA.

Em ainda outro aspecto, esta invenção refere-se a um método
5 para produzir pelo menos um PUFA em uma célula de soja que compreende:

(a) transformar uma célula de soja com um primeiro constructo de DNA que compreende:

(i) um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e,
10

(ii) pelo menos um constructo de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em uma delta-4 desaturase, uma delta-5
15 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17 desaturase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e uma elongase C_{20/22};

(b) regenerar uma planta de soja a partir da célula transformada da
20 etapa (a); e,

(c) selecionar essas sementes obtidas a partir das plantas da etapa (b) que têm um nível alterado de PUFA, em comparação ao nível nas sementes obtidas a partir de plantas de soja não transformadas.

Em outras realizações preferenciais da invenção, pelo menos um
25 constructo de DNA recombinante codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-9 elongase, por exemplo, a delta-9 elongase isolada ou derivada de *Isochrysis galbana* (número de acesso no GenBank, AF390174; IgD9e) ou a delta-9 elongase isolada ou derivada de *Euglena gracilis* conforme apresentado

na SEQ ID NO:39.

SISTEMAS DE EXPRESSÃO MICROBIANOS, CASSETES E VETORES E TRANSFORMAÇÃO

Os genes para delta-8 desaturase e os produtos dos genes descritos no presente pedido (isto é, EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3, 5 EaD8Des4 ou outras enzimas mutantes, enzimas com otimização de códon ou homólogas destas) também podem ser produzidas em células hospedeiras microbianas heterólogas, particularmente nas células de leveduras oleaginosas (por exemplo, *Yarrowia lipolytica*).

Os sistemas de expressão microbiana e vetores de expressão 10 contendo sequências reguladoras que direcionam altos níveis de expressão de proteínas estranhas são bem conhecidos pelos técnicos no assunto. Qualquer um destes poderia ser usado para construir genes quiméricos para produção de qualquer um dos produtos do gene das presentes sequências. Estes genes quiméricos poderiam, então, ser introduzidos nos microorganismos apropriados 15 através de transformação, para fornecer altos níveis de expressão das enzimas codificadas.

Vetores ou DNA cassetes úteis para a transformação de células hospedeiras microbianas adequadas são bem conhecidos na técnica. A escolha específica das sequências presentes no constructo é dependente dos 20 produtos de expressão desejados (acima), da natureza da célula hospedeira e dos meios propostos de separação de células transformadas *versus* células não transformadas. Tipicamente, no entanto, o vetor ou cassete de expressão contém sequências que direcionam transcrição e tradução dos gene(s) relevante(s), um marcador selecionável e sequências que permitem replicação 25 autônoma ou integração cromossômica. Vetores adequados compreendem uma região 5' do gene que controla iniciação da transcrição (por exemplo, um promotor) e uma região 3' do fragmento de DNA que controla a terminação da transcrição (isto é, um terminador). É preferível quando ambas as regiões de

controle são derivadas dos genes das células hospedeiras microbianas transformadas, embora se entenda que tais regiões de controle não precisam ser derivadas dos genes nativos para as espécies específicas escolhidas como um hospedeiro para produção.

5 Regiões de controle de iniciação ou promotores, que são úteis para direcionar expressão de ORFs das presentes delta-8 desaturases na célula hospedeira microbiana desejada, são numerosas e familiares para os técnicos no assunto. Praticamente, qualquer promotor capaz de direcionar a expressão destes genes na célula hospedeira selecionada é adequado para a
10 presente invenção. A expressão em uma célula microbiana pode ser realizada de uma maneira transitória ou estável. A expressão transitória pode ser realizada pela indução da atividade de um promotor regulável, ligado de maneira funcional ao gene de interesse. A expressão estável pode ser alcançada pelo uso de um promotor constitutivo, ligado de maneira funcional ao
15 gene de interesse. Como um exemplo, quando a célula hospedeira é levedura, as regiões funcionais de transcrição e tradução nas células de levedura são fornecidas, particularmente de espécies hospedeiras (por exemplo, consulte publicação PCT documento WO 2004/101757 e documento WO 2006/052870 para regiões reguladoras de iniciação de transcrição preferenciais para uso em
20 *Yarrowia lipolytica*). Qualquer uma das diversas sequências reguladoras pode ser usada, dependendo se é desejada a transcrição constitutiva ou induzida, da eficiência do promotor na expressão da ORF de interesse, da facilidade na construção, e similares.

 Descobriu-se que sequências de nucleotídeos que envolvem o
25 códon de iniciação de tradução "ATG" afetam a expressão em células de levedura. Se o polipeptídeo desejado é fracamente expresso em levedura, as sequências de nucleotídeos dos genes exógenos podem ser modificadas para incluir uma sequência de iniciação de tradução eficiente em levedura, para a

obtenção da máxima expressão gênica. Para expressão em levedura, isto pode ser feito por mutagênese dirigida ao sítio de um gene expresso de maneira ineficiente pela fusão de um gene endógeno de levedura, preferencialmente um gene altamente expresso. Alternativamente, pode-se
5 determinar a sequência consenso de iniciação de tradução no hospedeiro e elaborar geneticamente esta sequência nos genes heterólogos para sua ótima expressão no hospedeiro de interesse.

A região de terminação pode ser derivada da região 3' do gene a partir do qual a região de iniciação de tradução foi obtida ou a partir de um
10 gene diferente. Um grande número de regiões de terminação é conhecido, e funcionam satisfatoriamente em uma variedade de hospedeiros (quando utilizado tanto o mesmo gênero como gêneros e espécies diferentes, a partir das quais eles foram derivados). A região de terminação é usualmente selecionada mais como uma questão de conveniência do que por qualquer
15 propriedade específica. Preferencialmente, quando o hospedeiro microbiano é uma célula de levedura, a região de terminação é derivada de um gene de levedura (particularmente *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia* ou *Kluyveromyces*). As regiões 3' do genes de mamíferos que codificam γ -interferon e α -2 interferon são também conhecidas por funcionarem
20 em levedura. As regiões de controle de terminação também podem ser derivadas de vários genes nativos para os hospedeiros preferenciais. Opcionalmente, um sítio de terminação pode não ser necessário; embora seja preferível se incluído. Embora não destinadas a serem limitantes, as regiões de terminação úteis na presente divulgação incluem: região 3' com
25 aproximadamente 100 bp da protease extracelular de *Yarrowia lipolytica* (XPR; número de acesso no GenBank, M17741); a acil-coA oxidase (Aco3: números de acesso no GenBank, AJO01301 e CAA04661; terminador Pox3: número de acesso no GenBank, XP_503244); terminador Pex20 (número de acesso no

GenBank, AF054613); terminador Pexl6 (número de acesso no GenBank, U75433); terminador *Lip1* (número de acesso no GenBank, Z50020); terminador *Lip2* (número de acesso no GenBank, AJ012632); e terminador 3-oxoacil-coA tiolase (OCT; número de acesso no GenBank, X69988).

5 Como um técnico no assunto está ciente, meramente inserindo um gene no vetor de clonagem não garante que este será expresso com sucesso no nível necessário. Em resposta à necessidade para uma alta taxa de expressão, muitos vetores de expressão especializados foram criados pela manipulação de uma variedade de elementos genéticos diferentes que
10 controlam aspectos de transcrição, tradução, estabilidade de proteína, limite de oxigênio e secreção da célula hospedeira microbiana. Mais especificamente, algumas das características moleculares que foram manipuladas para controlar a expressão gênica incluem: (1) a natureza das sequências promotoras e terminadoras relevantes de transcrição; (2) o número de cópias do gene
15 clonado e se o gene é oriundo de um plasmídeo ou integrado no genoma da célula hospedeira; (3) a localização celular final da proteína estranha sintetizada; (4) a eficiência de tradução e correto dobramento da proteína no organismo hospedeiro; (5) a estabilidade intrínseca do mRNA e da proteína do gene clonado dentro da célula hospedeira; e (6) o uso do códon no gene
20 clonado, de modo que sua frequência se aproxime da frequência de uso do códon da célula hospedeira. Cada um destes tipos de modificações são englobados na presente invenção, como meio para também otimizar a expressão das delta-8 desaturases descritas no presente pedido.

 Uma vez que o DNA que codifica um polipeptídeo adequado para
25 expressão em uma célula hospedeira microbiana apropriada (por exemplo, levedura oleaginosa) tenha sido obtido (por exemplo, um gene quimérico que compreende um promotor, ORF e terminador), este é colocado em um vetor plasmidial capaz de realizar replicação autônoma em uma célula hospedeira;

ou ser diretamente integrado no genoma da célula hospedeira. A integração de cassetes de expressão pode ocorrer aleatoriamente dentro do genoma do hospedeiro ou pode ser direcionada por meio do uso de constructos contendo regiões de homologia com o genoma do hospedeiro, suficiente para atingir
5 recombinação dentro do *locus* do hospedeiro. Onde as construções são direcionadas para um *locus* endógeno, todas ou algumas das regiões reguladoras de transcrição e tradução podem ser fornecidas pelo *locus* endógeno.

Na presente invenção, o método preferencial para expressão de
10 genes em *Yarrowia lipolytica* é pela integração de DNA linear no genoma do hospedeiro; e, a integração em múltiplos locais dentro do genoma pode ser particularmente útil quando um alto nível de expressão gênica é desejado (por exemplo, no *locus Ura3* (número de acesso no GenBank, AJ306421), no *locus* do gene *Leu2* (número de acesso no GenBank AF260230), o gene *Lys5*
15 (número de acesso no GenBank M34929), o *locus* do gene *Aco2* (número de acesso no GenBank AJ001300), o *locus* do gene *Pox3* (*Pox3*: número de acesso no GenBank, XP_503244; ou, *Aco3*: número de acesso no GenBank, AJ001301), o *locus* do gene de delta-12 desaturase (publicação PCT documento WO2004/104167), o *locus* do gene *Lip1* (número de acesso no
20 GenBank, Z50020) e/ou o *locus* do gene *Lip2* (número de acesso no GenBank, AJ012632)).

De forma vantajosa, o gene *Ura3* pode ser usado repetidamente em combinação com a seleção de ácido 5-fluoro orótico (ácido 5-fluorouracil-6-carboxílico monohidrato; "5-FOA") (abaixo), para rapidamente permitir
25 modificações genéticas para ser integrado no genoma de *Yarrowia* de uma maneira fácil.

Onde dois ou mais genes são expressos a partir de vetores de replicação separados, é desejável que cada vetor tenha um meio diferente de

seleção e não tenha homologia com outro(s) constructo(s), para manter a expressão estável e evitar reagrupamento de elementos entre os constructos. A escolha criteriosa de regiões reguladoras, meios de seleção e métodos de propagação do constructo introduzido pode ser experimentalmente
5 determinada, de modo que todos os genes introduzidos sejam expressos nos níveis necessários para fornecer a síntese dos produtos desejados.

Constructos que compreendem o gene de interesse podem ser introduzidos em uma célula hospedeira microbiana por qualquer técnica padrão. Estas técnicas incluem transformação (por exemplo, transformação
10 por acetato de lítio (*Methods in Enzymology*, 194:186-187 (1991)), fusão protoplástica, impacto balístico, eletroporação, microinjeção, ou qualquer outro método que introduza o gene de interesse na célula hospedeira. Orientações mais específicas para leveduras oleaginosas (isto é, *Yarrowia lipolytica*) incluem patente US 4.880.741 e patente US 5.071.764 e Chen, D. C. *et al.*
15 (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48 (2):232235 (1997)).

Por conveniência, uma célula hospedeira que foi manipulada por qualquer método para introdução de uma sequência de DNA (por exemplo, um cassete de expressão) será referida como "transformada" ou "recombinante" no presente pedido. O hospedeiro transformado terá pelo menos uma cópia o
20 constructo de expressão e pode ter duas ou mais, dependendo se o gene está integrado no genoma, amplificado ou está presente no elemento extracromossomal tendo múltiplos números de cópias.

A célula hospedeira transformada pode ser identificada por várias técnicas de seleção, conforme descrito nas publicações PCT documento WO
25 2004/101757 e documento WO 2006/052870. Métodos preferenciais de seleção para uso no presente pedido são resistência à canamicina, higromicina e os amino glicosídeos G418, bem como a capacidade para crescer em meio sem uracila, leucina, lisina, triptofano ou histidina. Em realizações alternativas,

5-FOA é usado para seleção de leveduras mutantes Ura⁻. O composto é tóxico para células de levedura que possuem um gene URA3 funcional que codifica orotidina 5'-monofosfato descarboxilase (descarboxilase OMP); assim, baseado nesta toxicidade, 5-FOA é especialmente útil para seleção e identificação de linhagens de leveduras mutantes Ura⁻ (Bartel, P.L. e Fields, S., *Yeast 2-Hybrid System*, Oxford University: Nova York, volume 7, páginas 109 -147, 1997). Mais especificamente, pode inicialmente nocautear o gene Ura3 para produzir uma linhagem que possui fenótipo Ura⁻, sendo que a seleção ocorre com base na resistência ao 5-FOA. Dessa forma, um agrupamento de genes quiméricos múltiplos e um novo gene Ura3 pode estar integrado no interior de um *locus* diferente do genoma de *Yarrowia* para, então, produzir uma nova linhagem tendo um fenótipo Ura⁺. A subsequente integração produz uma nova linhagem Ura3⁻ (novamente identificada usando-se seleção 5-FOA), quando o gene Ura3 introduzido é nocauteado. Dessa forma, o gene Ura3 (em combinação com seleção 5-FOA) pode ser usado como um marcador de seleção em múltiplos ciclos de transformação.

Seguindo transformação, os substratos adequados para as presentes delta-8 desaturases (e opcionalmente outras enzimas de PUFA que são coexpressas dentro da célula hospedeira) podem ser produzidos pelo hospedeiro, tanto naturalmente como de forma transgênica, ou podem ser fornecidos de forma exógena.

Células hospedeiras microbianas para a expressão dos presentes genes e fragmentos de ácidos nucleicos podem incluir hospedeiros que crescem em uma variedade de matérias-primas, incluindo carboidratos simples e complexos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, óleos e álcoois e/ou hidrocarbonetos, em uma ampla faixa de valores de temperatura e pH. Com base nas necessidades do Titular da Depositante, os genes descritos na presente invenção serão expressos em uma levedura oleaginosa (e em

particular *Yarrowia lipolytica*); no entanto, é contemplado que pelo fato da transcrição, tradução e aparato biossintético de proteína serem altamente conservados, qualquer bactéria, levedura, alga e/ou fungo será um hospedeiro microbiano adequado para expressão dos presentes fragmentos de ácidos nucleicos.

Hospedeiros microbianos preferenciais, no entanto, são leveduras oleaginosas. Estes organismos são naturalmente capazes de síntese e acumulação de óleo, sendo que o óleo pode compreender mais do que cerca de 25% do peso celular seco, mais preferencialmente mais do que cerca de 30% do peso celular seco, e mais preferencialmente mais do que cerca de 40% do peso celular seco. Gêneros tipicamente identificados como leveduras oleaginosas incluem, mas não são limitados a: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*. Mais especificamente, leveduras ilustrativas que sintetizam óleo incluem: *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyii*, *L. lipoferus*, *Candida revkaui*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *Trichosporon pullans*, *T. cutaneum*, *Rhodotorula glutinus*, *R. graminis* e *Yarrowia lipolytica* (anteriormente classificada como *Candida lipolytica*).

A levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* é a mais preferida; e em uma realização adicional as linhagens mais preferenciais são linhagens de *Yarrowia lipolytica* designadas como ATCC #20362, ATCC #8862, ATCC #18944, ATCC #76982 e/ou LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., e Aggelis G., *Bioresour. Technol.* 82(1):43-9 (2002)).

Historicamente, várias linhagens de *Y. lipolytica* têm sido usadas para a fabricação e produção de: isocitrato liase; lipases; polihidroxicanoatos; ácido cítrico; eritritol; ácido 2-oxoglutarico; γ -decalactona; γ -dodecalatona e ácido pirúvico. Ensinaamentos específicos aplicáveis para elaborar geneticamente a produção de ARA, EPA e DHA em *Y. lipolytica* são fornecidos

no pedido de patente US 11/264784 (documento WO 2006/055322), pedido de patente US 11/265761 (documento WO 2006/052870) e pedido de patente US 11/264737 (documento WO 2006/052871), respectivamente.

Outros hospedeiros microbianos preferenciais incluem bactérias
5 oleaginosas, algas e outros fungos; e dentro deste amplo grupo de hospedeiros microbianos, são de interesse particular os microorganismos que sintetizam ácidos graxos ômega-3/ômega-6 (ou aqueles que podem ser geneticamente elaborados para este propósito (por exemplo, outra levedura como *Saccharomyces cerevisiae*). Dessa forma, por exemplo, a transformação de
10 *Mortierella alpina* (que é comercialmente usada para a produção de ARA) com qualquer um dos genes de delta-8 desaturase presentes, mediante o controle de promotores induzíveis ou regulados, poderia produzir um organismo transformante capaz de sintetizar quantidades crescentes de DGLA. O método de transformação de *M. alpina* é descrito por Mackenzie *et al.* (*Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4655 (2000)). De maneira similar, métodos para transformação
15 de microorganismos *Thraustochytriales* são divulgados na patente US 7.001.772.

Com base nos ensinamentos descritos acima, em uma realização esta invenção é dirigida a um método para a produção tanto de DGLA como
20 ETA, respectivamente, que compreende:

- (a) fornecer uma levedura oleaginosa que compreende:
 - (i) um primeiro constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e
25 (ii) uma fonte de substrato para desaturase que consiste tanto em EDA como ETrA, respectivamente; e
- (b) cultivar a levedura da etapa (a) na presença de uma fonte de carbono fermentável em que o gene que codifica um polipeptídeo delta-8

desaturase é expresso e EDA é convertido para DGLA, ou ETrA é convertido para ETA, respectivamente; e,

(c) opcionalmente recuperar o DGLA ou ETA, respectivamente, da etapa (b).

5 Pode ser necessário substrato para alimentação.

Certamente, visto que PUFAs naturalmente produzidos em leveduras oleaginosas estão limitados a ácidos graxos 18:2 (isto é, LA), e menos comumente, a ácidos graxos 18:3 (isto é, ALA), em realizações mais preferenciais da presente invenção, as leveduras oleaginosas serão
10 geneticamente elaboradas para expressar múltiplas enzimas necessárias para a biossíntese de PUFA de cadeia longa (dessa forma, permitindo a produção de ARA, EPA, DPA e DHA), em adição às delta-8 desaturases descritas no presente pedido.

Especificamente, em uma realização, esta invenção refere-se a
15 uma semente oleaginosa que compreende:

(a) um primeiro constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e,

20 (b) pelo menos um constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora que codifica pelo menos um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em: uma delta-4 desaturase, uma delta-5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-12
25 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17 desaturase, uma delta-9 elongase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e/ou uma elongase C_{20/22}.

Em realizações particularmente preferenciais, pelo menos um

constructo de DNA recombinante codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-9 elongase, por exemplo, a delta-9 elongase isolada ou derivada de *Isochrysis galbana* (número de acesso no GenBank, AF390174; IgD9e) ou a delta-9 elongase isolada ou derivada de *Euglena gracilis*, conforme
 5 apresentado na SEQ ID NO:39.

ENGENHARIA METABÓLICA DA BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E/OU

ÔMEGA-6 EM MICRORGANISMOS.

Métodos para manipulação das vias bioquímicas são bem conhecidos pelos técnicos no assunto; e espera-se que numerosas
 10 manipulações sejam possíveis para aumentar a biossíntese de ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6 em leveduras oleaginosas, e particularmente em *Yarrowia lipolytica*. Esta manipulação pode necessitar de engenharia metabólica diretamente dentro da via biossintética do PUFA ou manipulação adicional coordenada de várias outras vias metabólicas.

15 No caso de manipulações dentro da via biossintética do PUFA, pode ser desejável aumentar a produção de LA para permitir o aumento da produção de ácidos graxos ômega-6 e/ou ômega-3. Introdução e/ou amplificação dos genes que codificam delta-9 e/ou delta-12 desaturases podem realizar isto. Para aumentar a produção de ácidos graxos insaturados ômega-
 20 6, é bem conhecido pelos técnicos no assunto que a produção é favorecida em um microorganismo hospedeiro que é substancialmente isento de ALA; portanto, preferencialmente, o organismo é selecionado ou obtido pela remoção ou inibição da delta-15 ou da atividade de desaturase tipo ômega-3 que permite a conversão de LA para ALA. Alternativamente, pode ser
 25 desejável aumentar a produção de ácidos graxos ômega-3 (e minimizar a síntese de ácidos graxos ômega-6). Neste exemplo, pode-se utilizar um microorganismo hospedeiro em que a atividade de delta-12 desaturase, que permite a conversão de ácido oléico para LA, é removida ou inibida;

subsequentemente, cassetes de expressão apropriados seriam introduzidos no hospedeiro, junto com substratos apropriados (por exemplo, ALA) para a conversão para derivados de ácido graxo ômega-3 de ALA (por exemplo, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA, DHA).

5 Em realizações alternativas, vias bioquímicas que competem com as vias biossintéticas dos ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6 por energia ou carbono, ou enzimas da via biossintética nativa do PUFA, que interferem na produção de um produto final PUFA específico, podem ser eliminadas pela ruptura do gene ou infrarregulado para baixo por outros meios (por exemplo,
10 mRNA *antisense*).

A discussão detalhada de manipulações na via biossintética do PUFA como meio para aumentar ARA, EPA ou DHA (e técnicas associadas a esta) são apresentadas nas publicações PCT documento WO 2006/055322, documento WO 2006/052870 e documento WO 2006/052871, respectivamente,
15 como manipulações desejáveis na via biossintética e na via de degradação de TAG (e técnicas associadas a esta).

Dentro do contexto da presente invenção, pode ser útil modular a expressão da via biossintética de ácidos graxos por qualquer uma das estratégias descritas acima. Por exemplo, a presente invenção fornece
20 métodos através dos quais genes que codificam enzimas chave nas vias biossintéticas delta-9 elongase/delta-8 desaturase são introduzidos nas leveduras oleaginosas para a produção de ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6. Será particularmente útil expressar esses genes de delta-8 desaturase em leveduras oleaginosas que naturalmente não possuem as vias
25 biossintéticas de ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6 e coordenam a expressão destes genes para aumentar a produção de produtos PUFA preferidos, usando-se vários meios para engenharia metabólica do organismo hospedeiro.

PROCESSO DE FERMENTAÇÃO MICROBIANA PARA PRODUÇÃO DE PUFA

A célula hospedeira microbiana transformada é cultivada sob condições que melhoram a expressão dos genes de desaturase e produzem o maior e mais econômico rendimento dos PUFA's preferidos. Em geral, as condições do meio que podem ser melhoradas incluem o tipo e a quantidade da fonte de carbono, o tipo e quantidade da fonte de nitrogênio, a razão carbono-nitrogênio, a quantidade de diferentes íons minerais, o nível de oxigênio, a temperatura de crescimento, o pH, o período da fase de produção de biomassa, o período da fase de acúmulo de óleo e o tempo e método de extração das células. *Yarrowia lipolytica* geralmente é cultivada em meios complexos (por exemplo, caldo de extrato de levedura peptona-dextrose (YPD)) ou um meio mínimo definido que seja desprovido de um componente necessário para o crescimento e que, com isso, force a seleção dos cassetes de expressão desejados (por exemplo, Base de Nitrogênio para Levedura (Difco Laboratories, Detroit, MI)).

O meio de fermentação na presente invenção deve conter uma fonte de carbono adequada. Fontes de carbono adequadas são ensinadas na publicação PCT documento WO 2004/101757. Embora seja contemplado que a fonte de carbono utilizada na presente invenção possa englobar uma ampla variedade de fontes contendo carbono, as fontes de carbono preferencias são açúcar, glicerol e/ou ácidos graxos. Glicose e/ou ácidos graxos mais preferidos são aqueles que contêm entre 10 a 22 carbonos.

O nitrogênio pode ser suprido a partir de uma fonte inorgânica (por exemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ou orgânica (por exemplo, uréia ou glutamato). Além das fontes de carbono e nitrogênio apropriadas, o meio de fermentação também deve conter minerais adequados, sais, cofatores, tampões, vitaminas e outros componentes conhecidos pelos técnicos no assunto, adequados para o crescimento do hospedeiro oleaginoso e promoção das vias enzimáticas

necessárias para a produção do PUFA. Particular atenção é dada para diversos íons de metal (por exemplo, Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}) que promovem a síntese de lipídeos e PUFA (Nakahara, T. *et al.*, *Ind. Appl. Single Cell Oils*, D. J. Kyle and R. Colin, eds. páginas 61-97 (1992)).

5 O meio de crescimento preferencial na presente invenção são meios comuns, preparados comercialmente, como Base de Nitrogênio de Levedura (DIFCO Laboratories, Detroit, MI). Outro meio de crescimento definido ou sintético também pode ser usado e o meio apropriado para crescimento das células transformantes será conhecido pelo técnico no
10 assunto de microbiologia ou ciência da fermentação. Uma faixa de pH adequada para fermentação está tipicamente entre cerca de pH 4,0 a pH 8,0, sendo que pH 5,5 a 7,5 é preferencial como a faixa para condições iniciais de crescimento. A fermentação pode ser conduzida sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, sendo que condições microaeróbicas são preferenciais.

15 Tipicamente, o acúmulo de níveis altos de PUFA em células de leveduras oleaginosas exige um processo de duas etapas, visto que o estado metabólico deve ser “equilibrado” entre o crescimento e a síntese/armazenamento de gorduras. Dessa forma, mais preferencialmente, um processo de fermentação de duas etapas é necessário para a produção de
20 PUFA em leveduras oleaginosas (por exemplo, *Yarrowia lipolytica*). Esta abordagem está descrita na Publicação PCT documento WO 2004/101757, assim como vários projetos de processos de fermentação adequados (isto é, batelada, batelada alimentada e contínua) e considerações durante o crescimento.

25 PURIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DE ÓLEOS PUFA

Os PUFA podem ser encontrados no microrganismo hospedeiros e plantas como ácidos graxos livres ou nas formas estereificadas, como acilgliceróis, fosfolipídeos, sulfolipídeos ou glicolipídeos, e podem ser extraídos

da célula hospedeira através de uma variedade de meios conhecidos na técnica. Uma revisão das técnicas de extração, análise da qualidade e padrões de aceitação para lipídeos de leveduras é a de Z. Jacobs (*Critical Reviews in Biotechnology* 12 (5/6):463-491 (1992)). Uma breve descrição do processo a

5 jusante também está disponível por A. Singh e O. Ward (*Adv. Appl. Microbiol.* 45:271-312 (1997)).

Em geral, meios para purificação de PUFA's podem incluir extração com solventes orgânicos, sonicação, extração supercrítica de fluido (por exemplo, usando-se dióxido de carbono), saponificação e meios físicos

10 como prensa, ou combinações destes. Para maiores detalhes pode-se consultar a Publicação PCT documento WO 2004/101757. Métodos para o isolamento de sementes oleaginosas são bem conhecidos na técnica: (Young *et al.*, Processing of Fats and Oils, em The Lipid Handbook, Gunstone *et al.*, eds., Capítulo 5 páginas 253-257; Chapman & Hall: Londres (1994)). Por

15 exemplo, o óleo de soja é produzido usando-se uma série de etapas que envolvem a extração e purificação de um produto de óleo comestível a partir de sementes que produzem óleo. Óleos de soja e subprodutos de soja são produzidos usando-se as etapas gerais mostradas na tabela 3.

TABELA 3

20

ETAPAS GERAIS PARA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE SOJA E BIOPRODUTOS

Etapas do Processo	Processo	Impurezas Removidas e/ou Subprodutos Obtidos
# 1	semente de soja	
# 2	extração de óleo	alimento
# 3	degomação	lecitina
# 4	refinação alcalina ou física	gommas, ácidos graxos livres, pigmentos
# 5	lavagem com água	sabão
# 6	clareamento	cor, sabão, metal

Etapa do Processo	Processo	Impurezas Removidas e/ou Subprodutos Obtidos
# 7	(hidrogenação)	
# 8	fracionamento	estearina
# 9	desodorização	ácidos graxos livres, tocoferóis, esteróis voláteis
# 10	produtos oleosos	

Mais especificamente, as sementes de soja são limpas, misturadas, debulhadas e descascadas, aumentando assim a eficiência da extração de óleo. A extração de óleo é usualmente realizada pela extração por solvente (por exemplo, hexano), mas também pode ser alcançada por uma

5 combinação de pressão física e/ou extração por solvente. O óleo resultante é chamado de óleo cru. O óleo cru pode ser degomado por hidratação de fosfolipídios e outros complexos lipídicos polares e neutros, que facilitam sua separação a partir da fração de triglicerídeos não hidratados (óleo de soja). As gomas de lecitina resultantes podem ser, ainda, processadas para fabricar

10 produtos de lecitina comercialmente importantes, usados em uma variedade de alimentos e produtos industriais como emulsificação e liberação (isto é, agentes antiaderentes). O óleo degomado também pode ser refinado para a remoção de impurezas (principalmente de ácidos graxos livres, pigmentos e gomas residuais). A refinação é realizada pela adição de um agente cáustico que

15 reage com ácido graxo livre para formar sabão e hidratar fosfatídeos e proteínas no óleo cru. A água é usada para lavar traços de sabão formados durante a refinação. O subproduto de sabão pode ser usado na alimentação animal ou acidificado para recuperar os ácidos graxos livres. A cor é removida através da adsorção com um clareador de argila que remove a maioria dos

20 compostos de clorofila e carotenóides. O óleo refinado pode ser hidrogenado, com isso, resultando em gorduras com diferentes propriedades de fusão e

textura. O fracionamento (*winterization*) pode ser usado para remover estearina do óleo hidrogenado através de cristalização mediante condições de resfriamento cuidadosamente controladas. A desodorização (principalmente via destilação por vapor a vácuo) é a última etapa e é designada para remover compostos que transmitem odor ou sabor ao óleo. Outros subprodutos de valor, como tocoferóis e esteróis podem ser removidos durante o processo de desodorização. O destilado desodorizado contendo estes subprodutos pode ser vendido para a produção de vitamina E natural e outros produtos farmacêuticos de alto valor. Óleos e gorduras refinados, clareados (hidrogenados, fracionados) e desodorizados podem ser empacotados e vendidos diretamente ou, ainda, processados em produtos mais especializados. Uma referência mais detalhada para o processamento de semente de soja, produção de óleo de soja e utilização de subprodutos pode ser encontrada em Erickson, *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, The American Oil Chemists' Society and United Soybean Board (1995). O óleo de soja é líquido à temperatura ambiente porque é relativamente baixo em ácidos graxos saturados em comparação a óleos como, coco, palmeira, palmeira kernel e manteiga de cacau.

Plantas e óleos microbianos contendo PUFA's que foram refinados e/ou purificados podem ser hidrogenados, com isso, resultando em gorduras com diferentes propriedades de fusão e textura. Muitas gorduras processadas (incluindo pastas, gorduras de confeitaria, manteigas, margarinas, gorduras para massas, etc.) necessitam de graus variados de consistência à temperatura ambiente e podem ser produzidas apenas a partir de alterações das propriedades físicas da fonte de óleo. Isto é mais comumente alcançado através de hidrogenação catalítica.

A hidrogenação é uma reação química na qual o hidrogênio é adicionado às duplas ligações de ácido graxo insaturado com a ajuda de um

catalisador, como níquel. Por exemplo, o óleo de soja com alto teor contém ácidos graxos insaturados, oléico, LA e linolênico e cada um destes pode ser hidrogenado. A hidrogenação tem dois efeitos principais. Primeiro, a estabilidade oxidativa do óleo é aumentada como resultado da redução do conteúdo de ácido graxo insaturado. Segundo, as propriedades físicas do óleo são alteradas porque as modificações no ácido graxo aumentam o ponto de fusão, resultando em uma gordura semilíquida ou sólida, em temperatura ambiente.

Existem muitas variáveis que afetam a reação de hidrogenação que, em sequência, alteram a composição do produto final. Condições de operação incluindo pressão, temperatura, tipo e concentração do catalisador, agitação e projeto do reator, estão entre os parâmetros mais importantes que podem ser controlados. Condições de hidrogenação seletiva podem ser usadas para hidrogenar ácidos graxos mais insaturados, em detrimento dos menos insaturados. A hidrogenação muito leve ou parcial é frequentemente empregada para aumentar a estabilidade de óleos líquidos. Hidrogenação adicional converte um óleo líquido para um óleo fisicamente sólido. O grau de hidrogenação depende do desempenho desejado e das características de fusão designadas para o produto final específico. Gorduras líquidas para massas (usadas na fabricação de produtos de panificação, gorduras sólidas e gorduras utilizadas para fritura comercial e assados) e base para produção de margarina estão entre muitos dos possíveis óleos e produtos gordurosos conseguidos por meio da hidrogenação. Uma descrição mais detalhada da hidrogenação e produtos hidrogenados pode ser encontrada em Patterson, H. B. W., *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*. The American Oil Chemists' Society (1994).

Óleos hidrogenados se tornaram controversos, devido à presença de isômeros de ácidos graxo trans, que resultam do processo de hidrogenação.

A ingestão de grandes quantidades de isômeros trans foi associada aos efeitos prejudiciais à saúde, incluindo aumento da razão entre lipoproteínas de baixa densidade e alta densidade no plasma sanguíneo e aumento do risco de doenças cardiovasculares.

5 **ÓLEOS CONTENDO PUFA PARA USO NOS GÊNEROS ALIMENTÍCIOS**

O mercado atualmente suporta uma ampla variedade de alimentos e produtos para alimentação, que incorporam ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6 (particularmente ARA, EPA e DHA). É contemplado que óleos vegetais/de sementes, sementes alteradas e óleos microbianos da invenção
10 que compreendem PUFA funcionarão nos alimentos e produtos para alimentação para oferecer benefícios à saúde nas formulações atuais. Em comparação a outros óleos vegetais, acredita-se que os óleos da invenção funcionem de maneira similar aos outros óleos na aplicação para alimentos, de um ponto de vista físico (por exemplo, óleos parcialmente hidrogenados como
15 óleo de soja são amplamente utilizados como ingredientes para pastas macias, margarina e gorduras para assados e frituras).

Óleos vegetais, sementes alteradas e óleos microbianos contendo ácidos graxos ômega-3 e/ou ômega-6, conforme descritos no presente pedido, serão adequados para uso em uma variedade de alimentos e produtos para
20 alimentação incluindo, mas não se limitando a: análogos de alimentos, produtos de carne, produtos de cereais, produtos assados, aperitivos e laticínios. Adicionalmente, os presentes óleos vegetais/de sementes, sementes alteradas e óleos microbianos podem ser usados em formulações para oferecer benefícios à saúde em alimentos funcionais, incluindo nutrição funcional,
25 suplementos alimentares, fórmulas infantis, bem como produtos farmacêuticos. Um técnico no assunto no processamento de alimentos e formulações de alimentos entenderá qual a quantidade e composição dos óleos vegetais e microbianos poderão ser adicionados ao alimento ou produto para alimentação.

Tais quantidades serão referidas no presente pedido como uma quantidade “efetiva” e dependerão do alimento ou produto para alimentação, da dieta que o produto é destinado a suplementar ou a condição médica que o alimento funcional ou nutrição funcional é destinada a corrigir ou tratar

5 Análogos de alimentos podem ser fabricados usando-se processos bem conhecidos pelos técnicos no assunto. Pode-se mencionar análogos da carne, análogos do queijo, análogos do leite e similares. Análogos da carne fabricados a partir de soja contêm proteína de soja ou tofu e outros ingredientes misturados juntos para simular vários tipos de carne. Estas
10 carnes alternativas são vendidas como alimento congelado, enlatado ou frito. Usualmente, eles podem ser usados da mesma maneira que os alimentos que eles substituem. Carnes alternativas fabricadas a partir de soja são excelentes fontes de proteína, ferro e vitamina B. Exemplos de análogos da carne incluem, mas não se limitam a: análogos de presunto, análogos de salsicha,
15 análogos de bacon e similares.

 Análogos de alimentos podem ser classificados como imitação ou substitutos, dependendo de suas características funcionais e de composição. Por exemplo, uma imitação de queijo precisa apenas parecer o queijo que está destinado a substituir. No entanto, um produto pode geralmente ser chamado
20 de substituto de queijo, somente se for nutricionalmente equivalente ao queijo que está substituindo e que reúna exigências mínimas de composição para esse queijo. Dessa forma, um substituto de queijo frequentemente terá níveis altos de proteína em comparação às imitações de queijos e será enriquecido com vitaminas e minerais.

25 Análogos do leite ou produtos alimentícios não derivados do leite incluem, mas não se limitam a, imitações do leite e sobremesas congeladas não derivadas do leite (por exemplo, aqueles feitos de soja e/ou produtos de proteína de soja).

Produtos de carne englobam uma ampla variedade de produtos. Nos Estados Unidos “carne” inclui “carnes vermelhas” produzidas a partir de gado, porco e carneiro. Além das carnes vermelhas há aves, incluindo frango, peru, ganso; e ainda porquinho-da-índia, patos, peixes e moluscos. Existe uma
5 ampla classificação de produtos de carne, temperados e processados: fresco, conservado e frito, e conservado e cozido. Salsichas e cachorros-quentes são exemplos de produtos de carne processados. Dessa forma, o termo “produtos de carne” como usado no presente pedido inclui, mas não se limita a, produtos de carne processados.

10 Um produto de cereal é um produto alimentício derivado do processamento de um grão de cereal. Um grão de cereal inclui qualquer planta da família das gramíneas que produz um grão comestível (semente). Os grãos mais populares são cevada, milho, milheto, aveia, quinua, arroz, centeio, sorgo, triticale, trigo e arroz selvagem. Exemplos de produtos alimentícios de cereal
15 incluem, mas não se limitam a: grãos integrais, grãos prensados, grãos de aveia, farinha, farelo, germe, cereias para café da manhã, alimentos extrudados, massas e similares.

Um produto alimentício assado compreende qualquer um dos produtos alimentícios de cereais mencionados acima e que foram assados ou
20 processados de uma maneira comparável ao processo de assar (isto é, secar ou endurecer quando sujeito ao calor). Exemplos de produtos assados incluem, mas não se limitam a: pão, bolos, sonhos, barras, massas, migalhas de pão, salgadinhos assados, mini biscoitos, mini bolachas, mini cookies e mini pretzels. Como mencionado acima, óleos da invenção podem ser usados
25 como um ingrediente.

Um produto salgadinho compreende qualquer um dos produtos alimentícios descritos acima ou abaixo.

Um produto frito compreende qualquer um dos produtos

alimentícios descritos acima ou abaixo que foram fritos.

Um produto saudável é qualquer produto alimentício que forneça um benefício à saúde. Muitos produtos derivados de sementes oleaginosas podem ser considerados alimentos saudáveis.

5 Uma bebida pode ser um líquido ou uma forma seca em pó.

Por exemplo, pode-se mencionar bebidas não gaseificadas, como suco de frutas frescas, congelado, enlatado ou concentrado; leite aromatizado ou puro, etc. Fórmulas para adultos e para nutrição infantil são bem conhecidas na técnica e são comercialmente disponíveis (por exemplo, Similac®, Ensure®,
10 Jevity® e Alimentum® de Ross Products Division, Abbott Laboratories).

Fórmulas infantis são líquidas ou alimento em pó reconstituído, para bebês e crianças novas. "Fórmula infantil" é definida no presente pedido como um produto nutricional enteral que pode substituir o leite materno humano na alimentação de bebês e tipicamente é composto de uma
15 porcentagem desejada de mistura de gordura com porcentagem desejada de carboidratos e proteínas em uma solução aquosa (por exemplo, consulte patente US 4.670.285). Com base nos estudos de composição ao redor do mundo, bem como níveis especificados por grupos especialistas, o leite materno humano contém, em média, cerca de 0,20% a 0,40% de ácidos graxos
20 totais (assumindo cerca de 50% de calorias provenientes da gordura); e geralmente a razão de DHA para ARA estaria na faixa de cerca de 1:1 até 1:2 (consulte, por exemplo, formulações da Enfamil LIPIL" (Mead Johnson & Company) e Similac Advance™ (Ross Products Division, Abbott Laboratories)). Fórmulas infantis têm um papel especial nas dietas de bebês porque elas
25 frequentemente são a única fonte de nutrientes para os bebês; e embora a alimentação materna seja ainda a melhor nutrição para os bebês, a fórmula infantil é um alimento secundário suficientemente similar para que os bebês não somente sobrevivam, mas se desenvolvam.

Um laticínio é um produto derivado do leite. Um análogo do leite ou produto não lácteo é derivado de uma fonte exceto leite, por exemplo, leite de soja, conforme discutido acima. Estes produtos incluem, mas não se limitam a: leite integral, leite desnatado, produtos de leite fermentado, como iogurte ou leite azedo, creme de leite, manteiga, leite condensado, leite desidratado, branqueador para café, creme para café, sorvete, queijo, etc.

Produtos alimentícios adicionais nos quais os óleos que contêm PUFA da invenção poderiam ser incluídos são, por exemplo, chicletes, confeitos e cristalizados, gelatinas e pudins, balas macias e duras, geléias e gelatinas, açúcar branco granulado, substitutos do açúcar, caldas doces, coberturas e xaropes, e misturas secas em pó.

ÓLEOS CONTENDO PUFA PARA USO EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS SAUDÁVEIS E

FARMACÊUTICOS

Um produto alimentício saudável é qualquer produto alimentício que ofereça um benefício à saúde, e inclui alimentos funcionais, alimentos medicinais, nutrições medicinais e suplementos alimentares. Adicionalmente, os óleos vegetais/de sementes, sementes alteradas e óleos microbianos da invenção podem ser usados em composições farmacêuticas padrão (por exemplo, óleos contendo PUFA de cadeia longa poderiam facilmente ser incorporados em qualquer um dos produtos alimentícios acima mencionados e, dessa forma, produzir um alimento funcional ou medicinal). Formulações mais concentradas que compreendem PUFAS incluem cápsulas, pós, tabletes, géis, cápsulas de gel, líquidos concentrados e emulsões que podem ser usadas como um suplemento alimentar em humanos ou animais além de humanos.

ÓLEOS CONTENDO PUFA PARA USO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

A alimentação animal é genericamente definida no presente pedido como produtos que se destinam ao uso como alimentação ou para mistura na alimentação de animais, exceto humanos. Os óleos vegetais/de

sementes, óleos de sementes e microrganismos alterados podem ser usados como um ingrediente em diversos alimentos para animais.

Mais especificamente, embora não limitado o isso, espera-se que os óleos da invenção possam ser usados em produtos de alimentação para animais domésticos, ruminantes, alimentos para aves e produtos para alimentação em aquacultura. Produtos para alimentação de animais domésticos se destinam a alimentar um animal doméstico (por exemplo, cachorro, gato, pássaro, réptil, roedor). Estes produtos podem incluir os cereais e alimentos saudáveis acima, bem como carne e subprodutos da carne, produtos de proteína de soja, grama e produtos de forragem (por exemplo, alfafa, capim-de-rebanho, aveia ou *brome grass*, vegetais). Produtos para alimentação de ruminantes e aves são aqueles que se destinam a alimentar um animal (por peru, frango, gado, suíno). Assim como os alimentos para animais domésticos acima, estes produtos podem incluir cereais e produtos saudáveis, produtos de proteína de soja, carne e subprodutos da carne, grama e produtos de forragem como listados acima. Produtos para alimentação em aquacultura (ou "*aquafeeds*") são aqueles produtos que se destinam à utilização na aquacultura, que está relacionada à propagação, cultivo ou criação de organismos aquáticos e/ou animais de água doce ou marinhos.

20

EXEMPLOS

A presente invenção também é definida nos Exemplos a seguir, nos quais partes e porcentagens são em peso e graus são Celsius, a menos que determinado de outra forma. Deve-se entender que estes Exemplos, enquanto indicando realizações preferenciais da invenção, são fornecidos somente a título ilustrativo. A partir das discussões acima e destes Exemplos, o técnico no assunto pode averiguar as características essenciais desta invenção, e sem se afastar do espírito e escopo desta, pode fazer várias mudanças e modificações da invenção para adaptá-la a vários usos e

25

condições. Dessa forma, várias modificações da invenção além daquelas mostradas e descritas no presente pedido serão aparentes para os técnicos no assunto a partir da descrição anterior. Tais modificações também se destinam a serem incluídas dentro do escopo das reivindicações anexas.

5 O significado das abreviações é como a seguir: “sec” significa segundo(s), “min” significa minuto(s), “h” significa hora(s), “d” significa dia(s), “μl” significa microlitro(s), “ml” significa mililitro(s), “l” significa litro(s), “μm” significa micromolar, “mM” significa milimolar, “M” significa molar, “mmol” significa milimol(es), “μmol” significa micromol(es), “g” significa grama(s), “μg”
10 significa micrograma(s) e “ng” nanograma(s), “U” significa unidade(s), “bp” par(es) de base e “kB” significa kilobase(s).

MÉTODOS GERAIS

TRANSFORMAÇÃO E CULTIVO DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Linhagens de *Yarrowia lipolytica* com números de acesso ATCC
15 #20362, #76982 e #90812 foram adquiridas da Coleção Americana de Tipo de Cultura (Rockville, MD). As linhagens de *Yarrowia lipolytica* foram tipicamente cultivadas a 28°C em ágar YPD (1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona, 2% de glicose, 2% de ágar).

A transformação de *Yarrowia lipolytica* foi realizada de acordo
20 com o método de Chen, D. C. *et al.* (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(2):232-235 (1997)), a menos que apontado de outra forma. Rapidamente, *Yarrowia* foi riscada em uma placa YPD e crescida a 30°C por aproximadamente 18 h. Diversas porções grandes de crescimento celular foram raspadas da placa e resuspensas em 1 ml de tampão de transformação, compreendendo: 2,25 ml
25 de PEG a 50%, média MW 3350; 0,125 ml de acetato de Li a 2 M, pH 6,0; 0,125 ml de DTT a 2 M; e 50 μg de DNA de esperma de salmão fragmentado. Então, aproximadamente 500 ng de DNA de plasmídios linearizados foram incubados em 100 μl de células resuspensas, e mantidos a 39 °C por 1 h com

mistura de turbilhão com intervalos de 15 min. As células foram plaqueadas nas placas de meio de seleção e mantidas a 30°C por 2 a 3 dias

Para seleção de transformantes, meio mínimo ("MM") foi geralmente usado; a composição de MM é como a seguir: 0,17% de base nitrogênio de levedura (Difco 5 Laboratories, Detroit, MI) sem sulfato de amônio ou aminoácidos, 2% de glicose, 0,1% de prolina, pH 6,1. Suplementos de uracila foram adicionados como apropriado a uma concentração final de 0,01% (com isso produzindo meio de seleção "MMU", preparado com 20 g/l de ágar).

Alternativamente, os transformantes foram selecionados no meio de seleção com ácido 5-fluorótico ("FOA"; também ácido monohidrato 5-fluoruracil-6-carboxílico), compreendendo: 0,17% de base nitrogênio de levedura (Difco 5 Laboratories, Detroit, MI) sem sulfato de amônio ou aminoácidos, 2% de glicose, 0,1% de prolina, 75 mg/l de uracila, 75 mg/l de uridina, 900 mg/l de FOA (Zymo Research Corp., Orange, CA) e 20 g/l de ágar.

ANÁLISE DE ÁCIDO GRAXO DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

A menos que estabelecido de outra forma, para análise de ácido graxo, as células foram coletadas por centrifugação e os lipídeos foram extraídos conforme descrito em Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (*Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917 (1959)). Metil ésteres de ácido graxo foram preparados por transesterificação do extrato lipídico com metóxido de sódio (Roughan, G., e Nishida I. *Arch Biochem Biophys.* 276(1):38-46 (1990)) e subsequentemente analisados com um Hewlett-Packard 6890 GC ajustado com uma coluna 30 m X 0,25 mm (i.d.) HP-INNOWAX (Hewlett-Packard). A temperatura do forno era de 170°C (mantida 25 min) a 185°C a 3,5°C/min.

Para direcionar transesterificação de base, a cultura de *Yarrowia* (3 ml) foi colhida, lavada uma vez em água destilada, e seca a vácuo em um Speed-Vac por 5 a 10 min. Metóxido de sódio (100 µl de 1%) foi adicionado na

amostra, e então a amostra foi turbilhonada e agitada por 20 min. Após adicionar 3 gotas de NaCl a 1 M e 400 µl de hexano, a amostra foi turbilhonada e girada. A camada superior foi removida e analisada por CG conforme descrito acima.

5

EXEMPLO 1

IDENTIFICAÇÃO DE HOMÓLOGOS DA ENZIMA DELTA-8 DESATURASE A PARTIR DE

EUGLENA ANABAENA UTEX 373

O presente Exemplo descreve a identificação de um fragmento de cDNA (SEQ ID NO:1) que codifica uma delta-8 desaturase, a partir de *Euglena*
 10 *anabaena* UTEX 373. Este trabalho incluiu a geração de RNA, síntese de cDNA, geração de uma biblioteca de cDNA e, então, a identificação de uma cDNA que codifica uma delta-8 desaturase parcial, derivada a partir da amplificação por PCR da biblioteca de DNA usando-se oligonucleotídeos degenerados com base na sequência da delta-8 desaturase de *Euglena gracilis*
 15 (SEQ ID NO:2; descrita como Eg5 na publicação PCT documento WO 2006/012325).

CRESCIMENTO DE *EUGLENA ANABAENA* UTEX 373 E PREPARAÇÃO DE RNA

Euglena anabaena UTEX 373 foi obtida do laboratório do Dr. Richard Triemer na Michigan State University (East Lansing, MI).
 20 Aproximadamente 2 ml da cultura foram removidos para análise lipídica e centrifugados a 1.800 x g por 5 min. O *pellet* foi lavado uma vez com água e recentrifugado. O *pellet* resultante foi seco por 5 min a vácuo, resuspenso em 100 µl de hidróxido trimetilsulfônico (TMSH) e incubado em temperatura ambiente por 15 min com agitação. Depois disso, 0,5 ml de hexano foi
 25 adicionado e os frascos foram incubados por 15 min em temperatura ambiente com agitação. Metil ésteres de ácido graxo (5 µL injetado da camada de hexano) foram separados e quantificados usando-se Cromatografia Gasosa Hewlett Packard 6890 ajustada com uma coluna capilar de sílica fundida

Omegawax 320 (Supelco Inc., Cat. No. 24152). A temperatura do forno foi programada para ser mantida a 170 °C por 1,0 min, aumentando para 240 °C a 5 °C /min e então mantida por mais 1,0 min. O veículo gasoso foi fornecido por um gerador de hidrogênio Whatman. Períodos de retenção foram comparados para os metil ésteres de padrões comercialmente disponíveis (Nu-Chek Prep, Inc. Cat. No. U-99-A) e a cromatografia resultante é mostrada na figura 6. A presença de EDA, ERA, EPA e DHA no perfil de ácidos graxos, com a ausência de GLA e STA, sugeriu que *Euglena anabaena* utiliza a via delta-9 elongase/delta-8 desaturase para a biossíntese de LC-PUFA e seria uma boa fonte para genes biossintéticos LC-PUFA como, mas não limitada a, delta-8 desaturases.

Os 5 ml restantes de uma cultura em crescimento ativo foram transferidos para 25 ml de meio AF-6 (Watanabe & Hiroki, *NIES-Collection List of Strains*, 5ª ed., National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, 127 páginas (2004)) em um frasco de vidro de 125 ml. As culturas de *Euglena anabaena* foram cultivadas a 22 °C com ciclos de 16 h de luz, 8 h de escuro por 2 semanas com agitação bem suave.

Após 2 semanas, a cultura (25 ml) foi transferida para 100 ml de meio AF-6 em uma garrafa de vidro de 500 ml e manteve-se a cultura em crescimento, conforme descrito acima. Após este período, duas alíquotas de 50 ml foram transferidas para duas garrafas de vidro de 500 ml separadas contendo 250 ml de meio AF-6 e a cultura foi mantida em crescimento por dois meses, conforme descrito acima (fornecendo um total de aproximadamente 600 ml de cultura). Depois disso, as culturas foram transformadas em *pellets* por centrifugação a 1.800 x g por 10 min, lavadas uma vez com água e recentrifugada. O RNA total foi extraído de um dos *pellets* resultantes usando-se o reagente RNA STAT-60™ (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX) e seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante (usar 5 ml de reagente, RNA dissolvido

em 0,5 ml de água). Desta forma, 340 µg de RNA total (680 ug/ml) foram obtidos do *pellet*. O *pellet* restante foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C. O RNA foi isolado a partir de 340 µg do RNA total usando-se o Kit de Purificação de mRNA (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante. Desta maneira, 9,0 µg de mRNA foram obtidos.

PREPARAÇÃO DE cDNA DE *EUGLENA ANABAENA* E GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE cDNA Eug1c

Uma biblioteca de cDNA foi gerada usando-se o Kit de Construção de Biblioteca de cDNA Cloneminer™ (Cat. No.18249-029, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) e seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante (Versão B, 25-0608). Usando-se o método não radiomarcado, o cDNA foi sintetizado a partir de 5,12 µg de mRNA (descrito acima) usando-se o *primer* Biotin-*attB2*-Oligo(dT) . Após a síntese da primeira e da segunda fita, o adaptador *attB1* foi adicionado, ligado e o cDNA foi fracionado por tamanho usando-se coluna de cromatografia. O DNA das frações foram concentrados, recombinados em pDONR™222 e transformados no interior de células *E. coli* resistentes ao fago ElectroMAX™ DH10B™ T1 (Invitrogen Corporation). A biblioteca de *Euglena anabaena* foi denominada eeg1c.

A biblioteca de cDNA eug1c foi plaqueada sobre placas LBKan (aproximadamente 100.000 colônias), as colônias foram raspadas e o DNA foi isolado usando-se o Kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen Inc., Valencia, CA), seguindo-se o protocolo do fabricante. Desta forma, uma sub-biblioteca de DNA plasmidial de eug1c foi obtida.

IDENTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE cDNA QUE CODIFICAM PARCIALMENTE SUPOSTAS DELTA-8 DESATURASES

A sub-biblioteca de DNA plasmidial descrita acima foi usada como molde para degeneração por PCR usando-se *primers* degenerados, com base

na sequência de nucleotídeos da delta-8 desaturase de ácidos graxos de *Euglena gracilis* (SEQ ID NO:2) e o *primer* específico para vetor pDonor222Eg5-1 (SEQ ID NO:3). Os *primers* degenerados utilizados são mostrados na tabela 4.

5

TABELA 4**OLIGONUCLEOTÍDEOS DEGENERADOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR PORÇÕES DOS****GENES DE DELTA-8 DESATURASE DE *EUGLENA ANABAENA* UTEX 373**

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos	SEQ ID NO:
D8DEG3-1	RTTGTGNCKATCTTTCCACCA	SEQ ID NO:4
D8DEG3-2	RTTGTGNCKGTCTTTCCACCA	SEQ ID NO:5
D8DEG3-3	RTTGTGNCKATCCTTCCACCA	SEQ ID NO:6
D8DEG3-4	RTTGTGNCKGTCCTTCCACCA	SEQ ID NO:7

Um total de 5 reações foram realizadas para a amostra de cDNA.

A mistura de reação continha 1 µL de cDNA, 1 µL de cada um dos *primers* degenerados específicos para o vetor (20 µM) e foi realizado PCR usando-se a DNA Polimerase de Alta Fidelidade Phusion™ (Cat. No. F553S, Finnzymes Oy, Finland) seguindo-se o protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA resultantes foram clonados no vetor de clonagem pCR-Blunt® usando-se o Kit de Clonagem Zero Blunt®PCR (Invitrogen Corporation), seguindo-se o protocolo do fabricante.

O DNA plasmidial dos clones resultantes foram purificados usando-se o Kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen Inc.), seguindo-se o protocolo do fabricante e os insertos de DNA foram sequenciados nas extremidades em placas com 384 poços, usando-se o *primer* T7 iniciado para vetor (SEQ ID NO:8), *primer* M13rev-28 (SEQ ID NO:9) com o kit para sequenciamento ABI BigDye versão 3 Prism. Para a reação de sequenciamento, 100 a 200 ng de moldes e 6,4 pmol de *primers* foram usados, e as seguintes condições de

20

reação foram repetidas 25 vezes: 96°C por 10 seg., 50 °C por 5 seg. e 60 °C por 4 min. Após limpeza baseada em etanol, produtos de reação do ciclo de sequenciamento foram solucionados e detectados em sequenciadores automáticos Perkin-Elmer ABI 3700.

5 Uma sequência consenso foi montada a partir das sequências iniciais obtidas e um clone representativo chamado pHD23-1 (SEQ ID NO:10), tendo uma sequência idêntica à consenso foi escolhido para posterior estudo.

 A identificação do inserto de cDNA parcial em pHD23-1 (SEQ ID NO:1) como uma delta-8 desaturase parcial foi confirmada usando-se BLAST
10 (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, *Mol. Biol.* 215:403410 (1993)) que busca similaridade às sequências contidas no banco de dados "nr" BLAST (que compreende todas as traduções não redundantes GenBank CDS, sequências derivadas da estrutura tridimensional Brookhaven Protein Data Bank, o mais importante programa do banco de dados de sequência de
15 proteína SWISS-PROT, EMBL, e banco de dados DDBJ). A sequência de cDNA parcial obtida (SEQ ID NO:1) foi traduzidas em todos as fases de leitura e comparadas para similaridade para todas as sequências de proteína publicamente disponíveis contidas no banco de dados "nr" usando-se o algoritmo BLASTX (Gish e States, *Nat. Genet.* 3:266272 (1993)) fornecido pelo
20 NCBI com o parâmetro padrão e filtro desligado, Por conveniência, o valor P (probabilidade) para observação de uma compatibilidade de uma sequência de cDNA com uma sequência contida nos banco de dados de busca, meramente ao acaso como calculado pelo BLAST, são relatados no presente pedido como valores "pLog", que representam o negativo do logaritmo do valor P relatado.
25 Consequentemente, quanto maior o valor pLog, maior a probabilidade de que a sequência de cDNA e o "acerto" BLAST representem proteínas homólogas.

 A busca BLASTX que utiliza o inserto da sequência de nucleotídeos de pHD23-1 revelou similaridade da proteína codificada pelo

cDNA parcial (SEQ ID NO:1) para a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* (SEQ ID NO:11) (número de acesso no NCBI AAD45877(GI 5639724), locus AAD45877, CDS AF139720; Wallis and Browse, *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316 (1999)) e produziu um valor pLog de 5 63.4 (valor E de 4e-63).

EXEMPLO 2

ISOLAMENTO DA DELTA-8 DESATURASE INTEIRA A PARTIR DE *EUGLENA ANABAENA*

UTEX 373

Aproximadamente 17.000 clones da biblioteca de cDNA de eug1c 10 foram plaqueados sobre três placas de petri em amplos quadrados (24 cm x 24 cm) (Corning, Corning, NY), cada um contendo LB + 50 µg/ml de meio ágar canamicina. As células foram cultivadas durante a noite a 37 °C e as placas foram então resfriadas em temperatura ambiente.

TRANSFERÊNCIA DE COLÔNIAS

15 A membrana de biodina B com 0,45 µm (Cat. No. 60207, Pall Corporation, Pensacola, FL) foi cortada com aproximadamente 22 cm x 22 cm e a membrana foi cuidadosamente colocada no topo do ágar para evitar bolhas de ar. Após incubação por 2 min em temperatura ambiente, a membrana foi marcada para orientação, transferida com pinças e colocadas por cima da 20 colônia em um papel filtro embebido com hidróxido de sódio a 0,5 M e cloreto de sódio a 1,5 M. Após desnaturação por 4 min, o hidróxido de sódio foi neutralizado colocando-se a membrana em papel filtro embebido com Tris-HCL 0,5 M (pH 7,5) e cloreto de sódio a 1,5 M por 4 min. Esta etapa foi repetida e a membrana foi lavada rapidamente 2X com tampão SSC (20X SSC é cloreto de 25 sódio 3M, citrato de sódio 0,3 M; pH 7,0) e seca ao ar em filtro de papel.

HIBRIDIZAÇÃO

As membranas foram hibridizadas a 65 °C em 200 ml de solução para hibridização por 2 h. A solução para hibridização continha 6X SSPE (20X

SSPE é cloreto de sódio a 3 M, fosfato de sódio a 0,2 M, 20 mM de EDTA; pH 7,4), 5X reagente de Denhardt (100X reagente de Denhardt é Ficoll a 2%(p/v), polivinilpirrolidona a 2% (p/v), albumina de soro bovino acetilada a 2% (p/v), dodecil sulfato de sódio a 0,5% (SDS), 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão triturado e 5% de sulfato dextrano.

Foi feita uma sonda de DNA usando-se um gel de agarose purificado com fragmento de DNA de *EcoRI*, contendo o fragmento de DNA parcial da delta-8 desaturase de *Euglena anabaena*, de pHD23-1 (descrito no Exemplo 1) marcado com P³² dCTP usando-se o sistema de marcação de DNA RadPrime (Cat. No. 18428-011, Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo-se as instruções do fabricante. O P³² dCTP não incorporado foi separado usando-se uma coluna NICK (Cat. No. 17-0855-02, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), seguindo-se as instruções do fabricante. A sonda foi desnaturada por 5 min a 100 °C, colocada no gelo por 3 min e metade foi adicionada à solução de hibridização.

A membrana foi hibridizada com a sonda durante a noite a 65°C com leve agitação e então lavada no dia seguinte com 2X SSC contendo SDS a 0,5% (5 min cada) e duas vezes com 0,2X SSC contendo SDS a 0,1% (15 min cada). Após a lavagem, o hiperfilme (Cat. No. RPN30K, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) foi exposto à membrana durante a noite a -80 °C.

Com base no alinhamento das placas com o hiperfilme exposto, as colônias positivas foram retiradas usando-se a extremidade de uma pipeta Pasteur em 1 ml de água e turbilhonada. Foram feitas diversas diluições e plaqueadas sobre placas de Petri redondas pequenas (82 mm) contendo meio LB mais 50 µg/ml de canamicina, a fim de se obter colônias isoladas em cerca de 100 poços em uma única placa. Foram feitas transferências conforme descrito acima, exceto o uso de círculos de membrana NytranN (Cat, No. 10416116, Schleicher & Schuell, Keene, NH) e a hibridização foi realizada em

100 ml, usando-se a sonda remanescente radiomarcada. Desta maneira, foram confirmados os clones positivos.

Os clones positivos individuais foram cultivados a 37°C em LB + 50 µg/ml de meio líquido de canamicina e o plasmídio foi purificado usando-se o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc.), seguindo-se o protocolo do fabricante. O inserto de plasmídio foi sequenciado conforme descrito no Exemplo 1 com o kit de sequenciamento ABI BigDye versão 3 Prism usando-se *primer* T7 iniciado para vetor (SEQ ID NO:8), *primer* M13rev-28 iniciado para vetor (SEQ ID NO:9) e os oligonucleotídeos WobbleT iniciados para cauda poli A. Resumidamente, o *primer* WobbleT é uma mistura equimolar de 21 mer poli(T)A, poli(T)C, e poli(T)G, usado para sequenciar a extremidade 3' dos clones de cDNA. Com base nos dados de sequência iniciais, a sequência de fragmento interna adicional foi obtida de uma maneira similar, usando-se oligonucleotídeos EaD8seq-1 (SEQ ID NO:12). Desta maneira, as sequências inteiras do inserto dos clones da delta-8 desaturase de eug1c foram obtidas.

As sequências foram alinhadas e comparadas, usando-se Sequencher™ (Versão 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) e desta maneira, os clones puderam ser categorizados em um dos grupos distintos, com base na sequência dos insertos (chamadas EaD8Des1 a EaD8Des4). Clones representativos contendo o cDNA para cada classe de sequência foram escolhidos para estudos posteriores e as sequências para cada plasmídio representativo (pLF118-1, pLF118-2, pLF118-3 and pLF118-4) são mostradas nas SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:16, respectivamente. A sequência mostrada por uma linha de NNNN representa uma região da cauda poli-A que não foi sequenciada. As sequências codificadoras para EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 e EaD8Des4 são mostradas nas SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:20, respectivamente. As sequências de aminoácidos correspondentes para

EaD8Des1, EaD8Des2, EaD8Des3 e EaD8Des4 são mostradas nas SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente.

EXEMPLO 3

ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DAS SEQUÊNCIAS DA DELTA-8 DESATURASE DE 5 *EUGLENA ANABAENA UTEX 373* E COMPARAÇÃO COM UMA SEQUÊNCIA DE DELTA-8 DESATURASE DE *EUGLENA GRACILIS*

As sequências de aminoácidos para EaD8Des1 (SEQ ID NO:21), EaD8Des2 (SEQ ID NO:22), EaD8Des3 (SEQ ID NO:23) e EaD8Des4 (SEQ ID NO:24) foram comparadas usando-se o método Clustal W (usando-se o
10 programa MegAlign™ v 6.1 do programa integrado de computação para bioinformática da da LASARGENE (DNASTAR Inc.) com os parâmetros básicos para alinhamento múltiplo (PENALIDADE PARA GAP =10, PENALIDADE PARA EXTENSÃO DE GAP =0,2, (%) de Atraso na Divergência de Sequências (%)=30, Peso de Transição de DNA =0,5, Peso da Matriz
15 Protéina=Gonnet Series, Peso da Matris de DNA=IUB).

Em comparação a EaD8Des1 (SEQ ID NO:21), EaD8Des2 (SEQ ID NO:22) tem 3 substituições de aminoácidos (T110S, M223I & K251T; com base na numeração para EaD8Des1), EaD8Des3 (SEQ ID NO:23) tem 2 substituições de aminoácidos (T110S & K251T) e EaD8Des4 (SEQ ID NO:24)
20 tem 1 substituição de aminoácido (T110S).

As sequências de aminoácidos para EaD8Des1 (SEQ ID NO:21), EaD8Des2 (SEQ ID NO:22), EaD8Des3 (SEQ ID NO:23) e EaD8Des4 (SEQ ID NO:24) foram avaliadas pelo BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, *Mol. Biol.* 215:403410 (1993)) que busca similaridade às
25 sequências contidas no banco de dados "nr" BLAST (que compreende todas as traduções não redundantes GenBank CDS, sequências derivadas da estrutura tridimensional Brookhaven Protein Data Bank, o mais importante programa do banco de dados de sequência de proteína SWISS-PROT, EMBL, e banco de

dados DDBJ), usando-se parâmetros básicos e sem filtro. Por conveniência, o valor P (probabilidade) para observação de uma compatibilidade de uma sequência de cDNA com uma sequência contida nos banco de dados de busca, meramente ao acaso como calculado pelo BLAST, são relatados no presente pedido como valores "pLog", que representam o negativo do logaritmo do valor P relatado. Consequentemente, quanto maior o valor pLog, maior a probabilidade de que a sequência de cDNA e o "acerto" BLAST representem proteínas homólogas.

Todas as sequências apresentaram um valor pLog de 177 (valor P de e^{-177}) contra a sequência de aminoácidos da delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* (SEQ ID NO:11) (número de acesso no NCBI AAD45877(GI 5639724), locus AAD45877, CDS AF139720; Wallis and Browse, *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316 (1999)) quando comparadas aos dados "nr". As pontuações BLAST e probabilidades indicam que o fragmento de ácido nucléico atual codifica uma delta-8 desaturase de ácidos graxos de *Euglena anabaena*.

As sequências de aminoácidos para EaD8Des1 (SEQ ID NO:21), EaD8Des2 (SEQ ID NO:22), EaD8Des3 (SEQ ID NO:23) e EaD8Des4 (SEQ ID NO:24) foram então comparadas à sequência de aminoácidos coreta da delta-8 desaturase de *Euglena gracilis* (EgD8; SEQ ID NO:25; descrita como Eg5 no pedido PCT documento WO 2006/012325), usando-se Blast P (parâmetros básicos, sem filtro), Clustal V e os métodos de Jotun Hein de comparação de sequências, e a % de identidade usando-se cada método é mostrada na tabela 5. O alinhamento Clustal 5 destas cinco sequências de aminoácidos pode ser visto nas figuras 7A, 7B e 7C. A figura 8 é uma tabela que apresenta uma comparação da porcentagem de identidade (e porcentagem de divergência na metade triangular inferior) entre as cinco sequências de delta-8 desaturase alinhadas nas figuras 7A, 7B e 7C.

Cálculos de porcentagem de identidade de sequência realizados pelo método Clustal V (Higgins, D.G. e Sharp, P.M., *Comput. Appl. Biosci.* 5:151-153 (1989); Higgins *et al.*, *Comput. Appl. Biosci.* 8:189-191 (1992)) foram feitos usando-se o programa MegAlign™ v 6.1 do programa integrado de 5 computação para bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI) com os parâmetros básicos para alinhamento de pares (KTUPLE=1, PENALIDADE PARA GAP=3, JANELA=5, DIAGONAIS SALVAS=5 e PENALIDADE PARA EXTENSÃO DE GAP=10). Os cálculos de porcentagem de identidade de sequência realizados pelo método Jotun Hein (Hein, J. J., 10 *Meth. Enz.* 183:626-645 (1990)) foram feitos usando-se o programa MegAlign™ v 6.1 do programa integrado de computação para bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI) com os parâmetros básicos para alinhamento de pares (KTUPLE=2).

TABELA 5

15 **COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE EAD8DES1 (SEQ ID NO:21), EAD8DES2 (SEQ ID NO:22), EAD8DES3 (SEQ ID NO:23) E EAD8DES4 (SEQ ID NO:24) PARA EGD8 (SEQ ID NO:25)**

Desaturase	% de Identidade para EgD8 (SEQ ID NO:25) por BLASTP	% de Identidade para EgD8 (SEQ ID NO:25) pelo Método Jotun Hein	% de Identidade para EgD8 (SEQ ID NO:25) pelo Método Clustal V
EaD8Des1 (SEQ ID NO:21)	73%	74,4%	72,1%
EaD8Des2 (SEQ ID NO:22)	73%	74,2%	71,9%
EaD8Des3 (SEQ ID NO:23)	73%	74,2%	71,9%

Desaturase	% de Identidade para EgD8 (SEQ ID NO:25) por BLASTP	% de Identidade para EgD8 (SEQ ID NO:25) pelo Método Jotun Hein	% de Identidade para EgD8 (SEQ ID NO:25) pelo Método Clustal V
EaD8Des4 (SEQ ID NO:24)	73%	74,2%	71,9%

EXEMPLO 4

ANÁLISE FUNCIONAL DA DELTA-8 DESATURASES DE *EUGLENA GRACILIS* UTEX 373

EM *YARROWIA LIPOLYTICA*

O presente Exemplo descreve a análise funcional de quatro
 5 EaD8Des em *Yarrowia lipolytica*. Este trabalho incluiu as seguintes etapas:
 (1) amplificação por PCR de EaD8Des com sítios de restrição apropriados para
 clonagem a partir de plasmídios descritos no Exemplo 2; (2) clonagem dos
 produtos de PCR de EaD8Des no vetor de clonagem pCR-Blunt® (Invitrogen
 Corporation) para produzir pY120-1 to pY120-4; (3) clonagem dos genes de
 10 EaD8Des no vetor de expressão de *Yarrowia* pY115 para produzir pY175,
 pY176, pY177 e pY178; e, (4) comparação dos perfis lipídicos nos organismos
 transformantes que compreendem pY175, pY176, pY177 e pY178, após
 alimentação do substrato.

AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS GENES EAD8DES

15 A fim de introduzir sítios de restrição *NofI* e *NcoI* nas
 extremidades 5' das sequências codificadoras e um sítio *NofI* na extremidade 3'
 das sequências codificadoras, cada um dos genes EaD8Des foi amplificado por
 PCR. As sequências codificadoras para EaD8Des1 (SEQ ID NO:17),
 EaD8Des2 (SEQ ID NO:18), EaD8Des3 (SEQ ID NO:19) e EaD8Des4 (SEQ ID
 20 NO:20) foram amplificadas a partir de pLF118-1 (SEQ ID NO:13), pLF118-2
 (SEQ ID NO:14), pLF118-3 (SEQ ID NO:15) e pLF118-4 (SEQ ID NO:16),

respectivamente, com primers de oligonucleotídeos EaD8-5 (SEQ ID NO:26) e EaD8-3 (SEQ ID NO:27) usando-se a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion™ (Cat. No. F553S, Finnzymes Oy, Finland) seguindo-se o protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA resultantes foram clonados no vetor de clonagem pCR-Blunt® usando-se o Kit de Clonagem Zero Blunt®PCR (Invitrogen Corporation), seguindo-se o protocolo do fabricante, para produzir pKR906 (SEQ ID NO:28), pLF120-2 (SEQ ID NO:29), pLF120-3 (SEQ ID NO:30) e pLF120-4 (SEQ ID NO:31), respectivamente.

CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE *YARROWIA* PY115, PY175, PY176,

PY177 E PY178

O plasmídio pY5-30 (que foi previamente publicado na Publicação PCT documento WO 2005/003310 (o conteúdo deste é incorporado ao presente como referência) é um plasmídio do tipo ponte que pode replicar tanto em *E. coli* como *Yarrowia lipolytica*. O plasmídio pY5-30 contém o seguinte:

uma sequência de replicação autônoma de *Yarrowia* (ARS18); uma origem de replicação do plasmídio ColE1; um gene resistente à ampicilina (AmpR), para seleção em *E. coli*; um gene LEU2 de *Yarrowia*, para seleção em *Yarrowia*; e um gene quimérico TEF::GUS::XPR. O plasmídio pDMW263 (SEQ ID NO:32) foi criado a partir de pY5-30, pela reposição do promotor TEF com o promotor de *Yarrowia lipolytica* FBAINm (Publicação PCT documento WO 2005/049805) usando-se técnicas bem conhecidas pelos técnicos no assunto. Resumidamente, este promotor refere-se a um promotor modificado que está localizado na região a montante 5' em frente ao códon de iniciação de tradução "ATG" da enzima frutose-bifosfato aldolase (E.C. 4.1.2.13) codificada pelo gene *fbp1* e que é necessário para expressão, mais uma porção da região codificadora 5' que possui um intron, em que FBAINm tem uma deleção de 52 bp entre o códon de iniciação de tradução ATG e o intron do promotor FBAIN (com isso incluindo somente 22 aminoácidos do N-terminal) e um novo *motif*

consenso após o intron. A Tabela 6 resume os componentes do pDMW263 (SEQ ID NO:32).

TABELA 6
COMPONENTES DO PLASMÍDIO PDMW263

Sítios RE e Nucleotídeos Na SEQ ID NO:32	Descrição Do Fragmento E Componentes Do Gene Quimérico
4992-4296	<u>SEQUÊNCIA ARS18 SEQUENCE (NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK, A17608)</u>
<i>Sall/SacII</i> (8505-2014)	FBAINm::GUS::XPR, que compreende: - FBAINm: promotor FBAINm (documento WO 2005/049805) - GUS: gene que codifica β-glucuronidase de <i>E. coli</i> (Jefferson, R.A. <i>Nature</i>. 14:342:837-838 (1989)) - XPR: região 3' com aproximadamente 100 bp do gene <i>Xpr</i> de <i>Yarrowia lipolytica</i> (número de acesso no GenBank, M17741)
6303-8505	gene <i>Leu2 Yarrowia</i> (número de acesso no GenBank, AF260230)

5 O fragmento de DNA *NcoI/SalI* de pDMW263 (SEQ ID NO:32), contendo o promotor FBAINm de *Yarrowia lipolytica* foi clonado no fragmento de DNA *NcoI/SalI* de pDMW237 (SEQ ID NO:33), previamente descrito na publicação PCT documento WO 2006/012325 (o conteúdo deste é incorporado ao presente como referência), contendo um gene de delta-9 elongase sintética

10 derivado de *Isochrysis galbana* e com otimização de códon para expressão em *Yarrowia lipolytica*, para produzir pY115 (SEQ ID NO:34, figura 2). Na figura 2, os promotores FBAINm modificados são chamados FBA1 + intron. Também como FBA1 + Intron em outras figuras, bem como YAR FBA1 PRO + Intron, e esses termos são usados alternadamente com FBAINm.

15 Os fragmentos de DNA *NcoI/NotI* DNA de pLF120-1 (SEQ ID

NO:28), pLF120-2 (SEQ ID NO:29), pLF120-3 (SEQ ID NO:30) e pLF120-4 (SEQ ID NO:31), contendo EaD8Des, foram clonados no fragmento de DNA *NcoI/NofI* de pY115, contendo o promotor FBAINm de *Yarrowia lipolytica*, para produzir pY175 (SEQ ID NO:35; FIG. 3A), pY176 (SEQ ID NO:36; FIG. 3B),
 5 pY177 (SEQ ID NO:37; FIG. 3C) e pY178 (SEQ ID NO:38; FIG. 3D), respectivamente.

ANÁLISE FUNCIONAL DOS QUATRO GENES EAD8DES EM YARROWIA LIPOLYTICA

A linhagem Y2224 foi isolada da seguinte maneira: Células de *Yarrowia lipolytica* ATCC #20362 de uma placa de ágar YPD (1% de extrato de
 10 levedura, 2% de bactopectona, 2% de glicose, 2% de ágar) foram riscadas em uma placa com meio mínimo (75 mg/l de cada, uracila e uridina, 6,7 g/l de YNB com sulfato de amônio, sem aminoácido, e 20 g/l de glicose) contendo 250 mg/l de 5-FOA (Zymo Research). As placas foram incubadas a 28°C e quatro das colônias resultantes foram aderidas separadamente nas placas com meio
 15 mínimo contendo 200 mg/ml de 5-FOA e placas com meio mínimo sem uracila e uridina para confirmar uracila *Ura3* auxotrófico.

A linhagem Y2224 foi transformada com pY175 (SEQ ID NO:35; FIG. 3A), pY176 (SEQ ID NO:36; FIG. 3B), pY177 (SEQ ID NO:7; FIG. 3C) e pY178 (SEQ ID NO:38; FIG. 3D), conforme descrito nos Métodos Gerais.

20 Colônias individuais de transformantes *Yarrowia lipolytica* contendo pY175-pY178 foram cultivadas em 3 ml de meio mínimo sem uracila suplementado com tergitol a 0,2% a 30°C por 1 dia. Depois disso, 0,1 ml foi transferido para 3 ml do mesmo meio suplementado com ácido eicosadienóico [EDA - 20:2(11,14)] ou ácido eicosatrienóico [ERA - 20:3(11,14,17)] para 0,175
 25 mM. Estas foram incubadas por 16 h a 30°C, 250 rpm e então *pellets* foram obtidos por centrifugação. As células foram lavadas uma vez com água, agrupadas por centrifugação e secas ao ar. Os *pellets* foram transesterificados (Roughan, C., e Nishida I. *Arch Biochem Biophys.* 276(1):38-46 (1990)) com

500 µL de metóxido de sódio a 1% por 30 min a 50°C após o qual 500 µL de cloreto de sódio a 1 M de 100 µl de heptano foram adicionados. Após completar a mistura e centrifugação, metil ésteres de ácido graxo (FAMES) foram analisados por GC. FAMES (5 µL injetado da camada de hexano) foram

5 separados e quantificados usando-se Cromatografia Gasosa Hewlett Packard 6890 ajustada com uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., Cat. No. 24152). A temperatura do forno foi programada para ser mantida a 220 °C por 2,6 min, aumentando para 240 °C a 20 °C /min e então mantida por mais 2,4 min. O veículo gasoso foi fornecido por um gerador

10 de hidrogênio Whatman. Tempos de retenção foram comparados àqueles para metil ésteres de padrões comercialmente disponíveis (Nu-Chek Prep, Inc).

Os perfis de ácidos graxos para *Yarrowia lipolytica* que expressam pY175-pY178 são mostrados na figura 4. A porcentagem de dessaturação C20 (C20 % delta-8 desat) foi calculada tanto pela divisão da %

15 em peso para DGLA pela soma da % em peso para EDA e DGLA e multiplicando-se por 100 para expressar uma %, como pela divisão da % em peso para ETA pela soma da % em peso para ERA e DTA e multiplicando-se por 100, para expressar uma %, dependendo de qual substrato foi alimentado (EDA ou ERA). As médias são indicadas por Ave. seguido pelo título

20 apropriado. A razão de dessaturação de EDA para ERA é claculada pela divisão de Ave. C20 % delta-8 desat por EDA por aquela de ERA.

Todas as delta-8 desaturases de *Euglena anabaena* funcionam bem de maneira similar em *Yarrowia* e convertem aproximadamente 50% de EDA para DGLA. Parece haver uma leve preferência de EDA sobre ERA com

25 uma razão de EDA/ERA de 1:1 a 1:2.

EXEMPLO 5

CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO DE SOJA PKR1152 PARA COEXPRESSION DA DELTA-8 DESATURASE (EAD8DES3) DE *EUGLENA ANABAENA* UTEX 373 COM UMA

DELTA-9 ELONGASE DERIVADA DE *EUGLENA GRACILIS* (EGD9E)

O presente Exemplo descreve a construção de um vetor de soja para coexpressão de EaD8Des3 com EgD9e.

DELTA-9 ELONGASE DE *EUGLENA GRACILIS* (EGD9E)

5 Um clone da biblioteca de cDNA de *Euglena* (eeg1c), chamado eeg1c.pk001.n5f, contendo a delta-9 elongase de *Euglena gracilis* (EgD9e; SEQ ID NO:39; que está descrito no pedido US 11/601.563 (depositado em 16 de novembro de 2006, que foi publicado em 24 de maio de 2007; Número de Registro Legal BB-1562), o conteúdo deste são incorporados ao presente
10 pedido como referência) foi usado como molde para amplificar EgD9elo com *primers* de oligonucleotídeos oEugEL1-1 (SEQ ID NO:40) e oEugEL1-2 (SEQ ID NO:41) usando-se DNA polimerase VentR® (Cat. No. M0254S, New England Biolabs Inc., Beverly, MA), seguindo-se o protocolo do fabricante. O fragmento de DNA resultante foi clonado no vetor de clonagem pCR-Blunt®
15 usando-se o Kit de Clonagem Zero Blunt®PCR (Invitrogen Corporation), seguindo-se o protocolo do fabricante, para produzir pKR906 (SEQ ID NO:42).

Um plasmídio de iniciação pKR72 (número de acesso ATCC, PTA-6019; SEQ ID NO:43, sequência de 7085 bp), um derivado do pKS123 que foi previamente descrito na publicação PCT documento WO 02/008269 (o
20 conteúdos deste é incorporado ao presente pedido como referência), contém o gene higromicina B fosfotransferase (HPT) (Gritz, L. e Davies, J., *Gene* 25:179-188 (1983)), ladeados pelo promotor T7 e terminador de transcrição (cassete T7prom/HPT/T7term), e uma origem de replicação de bactéria (ori) para seleção e replicação em bactéria (por exemplo, *E. coli*). Além disso, pKR72
25 também contém HPT, ladeado pelo promotor 35S (Odell et al., *Nature* 313:810-812 (1985)) e terminador de transcrição NOS 3' (Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-570 (1982)) (35S/HPT/NOS3' cassete) para seleção em plantas como soja. pKR72 também contém um sítio de restrição *NotI*, ladeado pelo

promotor para a subunidade α' de β -conglucina (Beachy *et al.*, *EMBO J.* 4:3047-3053 (1985)) e região terminadora de transcrição 3' do gene faseolina (Doyle *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261:9228-9238 (1986)), dessa forma, permitindo a expressão forte específica para o tecido nas sementes de soja dos genes clonados no sítio *NotI*.

EgD9e foi liberado do plasmídio pKR906 (SEQ ID NO:42) pela digestão com *NotI* e clonado no sítio *NotI* do pKR72r (SEQ ID NO:43) para produzir pKR912 (SEQ ID NO:44). Em alguns exemplos, pKR912 é denominado pKR1010, mas eles não são idênticos.

10 **DELTA-8 DESATURASE (EAD8DES3) DE EUGLENA ANABAENA UTEX 373**

O vetor pKR457 (SEQ ID NO:45), que foi previamente descrito na publicação PCT documento WO 2004/071467 (o conteúdo deste é incorporado ao presente pedido como referência), contém um sítio *NotI* ladeado pelo promotor Kunitz inibidor de tripsina de soja (KTI) (Jofuku *et al.*, *Plant Cell* 15 1:10791093 (1989)) e pela região de terminação 3' de KTI, o isolamento deste está descrito na patente US 6.372.965, seguido pela terminação de transcrição da albumina, que foi previamente descrita na Publicação PCT documento WO 2004/071467 (cassete Kti/*NotI*/Kti3'Salb3').

O fragmento *NotI* de pLF120-3 (SEQ ID NO:30), contendo o gene EaD8Des3 foi clonado no sítio *NotI* do pKR457 (SEQ ID NO:45) para produzir pKR1138 (SEQ ID NO:46).

O fragmento *BsWI* do pKR1138 (SEQ ID NO:46), contendo o gene EaD8Des3 foi clonado no sítio *BsWI* do pKR912 (SEQ ID NO:44) para produzir pKR1152 (SEQ ID NO:47, figura 5). Na figura 5, a delta-9 elongase de *Euglena gracilis* (EdD9e) é chamada eug el1.

EXEMPLO 6

PRODUÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE SISTEMA MODELO DE CULTURA EMBRIONÁRIA SOMÁTICA DE SOJA COM VETORES DE EXPRESSÃO DE SOJA E REGENERAÇÃO

VEGETAL

CONDIÇÕES DE CULTURA

Culturas de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) são mantidas em 35 ml de meio líquido SB196 (abaixo) em um agitador giratório, 5 150 rpm, 26°C com luzes fluorescentes brancas frias em fotoperíodo 16:8 h dia/noite na intensidade de luz de 60-85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. As culturas são subcultivadas a cada sete dias por duas semanas por inoculação de aproximadamente 35 mg de tecido em 35 ml de SB196 líquido fresco (o intervalo de subcultura preferencial é a cada sete dias).

10 As culturas de suspensão embriogênicas de soja são transformadas com os plasmídios de expressão pelo método de bombardeamento de partículas (Klein *et al.*, *Nature*, 327:70 (1987)), usando-se um instrumento de Biobalística DuPont PDS1000/HE (aperfeiçoado com hélio) para todas as transformações.

15 INICIAÇÃO DE CULTURA DE SUSPENSÃO EMBRIOGÊNICA DE SOJA

As culturas de soja são iniciadas duas vezes a cada mês com cinco a sete dias entre cada iniciação. Vagens com sementes imaturas de plantas de soja disponíveis são colhidas entre 45 a 55 dias após o plantio. As sementes são removidas das vagens e colocadas em uma caixa magenta esterelizada. 20 As sementes de soja são esterelizadas por agitação por 15 min em uma solução de Clorox a 5% com uma gota de sabão *ivory* (isto é, 95 ml de água destilada autoclavada mais 5 ml de Clorox e 1 gota de sabão – misturar bem). As sementes são enxaguadas usando-se 2 garrafas de 1 litro de água destilada estéril, e aquelas menores que 4 mm são colocadas em placas de 25 microscópio individuais. A terminação menor da semente é cortada e os cotilédones pressionados para fora do tegumento. Quando as culturas estavam sendo preparadas para produção de transformação, os cotilédones são transferidos para as placas contendo meio SB1 (25 a 30 cotilédones por

placa). As placas são embrulhadas com fita de fibra e foram mantidas a 26 °C com luz fluorescente branca fria em fotoperíodo 16:8 h dia/noite com intensidade de luz de 60 a 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ por oito semanas, com uma troca de meio após 4 semanas. Quando as culturas estão sendo preparadas para experimentos de sistema modelo, os cotilédones são transferidos para as placas contendo meio SB1 (25 a 30 cotilédones por placa) por 2 semanas e então transferidos para SB1 por 2 a 4 semanas. As condições de luz e temperatura são as mesmas que as descritas acima. Após incubação em meio SB1, embriões secundários são cortados e colocados em meio líquido SB196 por 7 dias.

PREPARAÇÃO DE DNA PARA BOMBARDEAMENTO

Tanto um plasmídio intacto como um fragmento de DNA de plasmídio contendo os genes de interesse e gene marcador selecionável são usados para bombardeamento. Os fragmentos de plasmídios de expressão de soja são obtidos pelo isolamento em gel de plasmídios digeridos. Em cada caso, são usados 100 μg de DNA de plasmídio em 0,5 ml da mistura de enzima específica descrita abaixo. Os plasmídios são digeridos com *Ascl* (100 unidades) em NEBuffer4 (Tris-acetato a 20 mM, acetato de magnésio a 10 mM, acetato de potássio a 50 mM, ditiotretol a 1 mM, pH 7,9), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA, e beta-mercaptoetanol a 5 mM a 37°C por 1,5 h. Os fragmentos de DNA resultantes são separados por eletroforese em gel de agarose a 1% SeaPlaque® GTG (BioWhitaker Molecular Applications) e os fragmentos de DNA contendo genes cassetes são retirados do gel de agarose. O DNA é purificado da agarose usando-se enzimas de digestão GELase®, seguindo-se o protocolo do fabricante.

Uma alíquota de 50 μl de água destilada estéril contendo 3 mg de partículas de ouro (3 mg de ouro) é adicionada a 30 μl de uma solução de 10 ng/ μl de DNA (tanto plasmídio intacto como fragmento de DNA preparado como

descrito acima), 25 µl de 5 M CaCl₂ e 20 µl de espermidina a 0,1 M. A mistura é agitada por 3 minutos em nível 3 de um agitador de turbilhão e girado por 10 seg. em uma microcentrífuga de bancada. O sobrenadante é removido, seguido por uma lavagem com 400 µl de etanol 100% e outra breve centrifugação. Os 400 µl de etanol são removidos e o *pellet* é resuspenso em 40 µl de etanol 100%. Cinco µl de suspensão de DNA é colocada em cada disco do instrumento de discos de Biobalística PDS1000/HE. Cada alíquota de 5 µl contém aproximadamente 0,375 mg de ouro por bombardeamento (por exemplo, por disco).

Para transformações de sistema modelo, o protocolo é idêntico, exceto por pequenas mudanças (isto é, 1 mg de partículas de ouro é adicionado a 5 µl de uma solução de 1 µg/µl de DNA, 50 µl de 2,5 M de CaCl₂ é usada e o *pellet* é finalmente resuspenso em 85 µl de etanol 100%, fornecendo assim 0,058 mg de partículas de ouro por bombardeamento).

PREPARAÇÃO DO TECIDO E BOMBARDEAMENTO COM DNA.

Aproximadamente 150 a 200 mg de culturas de suspensão embrionária de sete dias são colocadas em uma placa de petri de 60 x 15 mm vazia e estéril, e a placa é coberta com rede plástica. A câmara é evacuada com vácuo de 27 a 28 polegadas de mercúrio, e o tecido é bombardeado com um ou dois tiros por placa com ruptura de membrana com pressão ajustada a 1100 PSI. O tecido é colocado a aproximadamente 3,5 polegadas da tela de parada/de retenção. As condições de transformação do sistema modelo são idênticas, exceto que 100 a 150 mg de tecido embriogênico é usado, a pressão de ruptura é estabelecida a 650 PSI e o tecido é colocado a aproximadamente 2,5 polegadas da tela de retenção.

SELEÇÃO DE EMBRIÕES TRANSFORMADOS

Os embriões transformados são selecionados usando-se tanto higromicina (quando o gene higromicina B fosfotransferase (HPT) é usado

como marcador selecionável) como clorosulfurona (quando o gene acetolactato sintase (ALS) é usado como marcador selecionável).

Após o bombardeamento, o tecido é colocado em meio SB196 fresco e cultivado conforme descrito acima. Seis a oito dias após o bombardeamento, o SB196 é trocado por SB196 fresco contendo tanto 30 mg/l de higromicina ou 100 ng/ml de clorosulfurona, dependendo do marcador selecionável utilizado. O meio de seleção é renovado semanalmente. Quatro a seis semanas após a seleção, o tecido verde transformado é observado crescendo a partir de agrupamentos embriogênicos necróticos não transformados.

MATURAÇÃO DO EMBRIÃO

Para a produção de transformantes, o tecido verde isolado é removido e inoculado em placas de multi-poços para gerar novas culturas de suspensão embriogênicas transformadas, propagadas por clonagem. Os agrupamentos embriogênicos transformados são cultivados por quatro a seis semanas em placas multi-poços a 26°C em SB196 sob lâmpadas frias fluorescentes brancas (Phillips cool white Econowatt F40/CW/RS/EW) e lâmpadas Agro de 40 watt (Phillips F40 Agro) em um fotoperíodo 16:8 h com intensidade de luz de 90 a 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Após este período, os grupos de embriões são removidos para um meio de ágar sólido, SB166, por uma a duas semanas e então subcultivados em meio SB103 por 3-4 semanas para embriões maduros. Após maturação em placas SB103, os embriões individuais são removidos dos agrupamentos, secos e selecionados para alterações em suas composições de ácido graxo conforme descrito no Exemplo 7.

Para sistema modelo de transformação, os embriões são maturados em meio líquido de histodiferenciação e maturação na soja (meio líquido SHaM; Schmidt et al., *Cell Biology and Morphogenesis* 24:393 (2005))

- usando-se um procedimento modificado. Resumidamente, após 4 semanas de seleção em SB196 conforme descrito acima, os grupos de embriões são removidos para 35 ml de SB228 (meio líquido SHaM) em um frasco Erlenmeyer e 250 ml. O tecido é mantido em meio líquido SHaM em um agitador giratório a
- 5 130 rpm e 26°C com luzes fluorescentes brancas frias em fotoperíodo 16:8 h dia/noite na intensidade de luz de 60-85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ por 2 a 3 semanas como embriões maduros. Embriões crescidos por 2 a 3 semanas em meio líquido SHaM são equivalentes em tamanho e conteúdo aos embriões cultivados em SB166/SB103 por 5 a 8 semanas.
- 10 Após maturação em meio líquido SHaM, os embriões individuais são removidos dos agrupamentos, secos e selecionados para alterações em suas composições de ácido graxo conforme descrito no Exemplo 7.

RECEITAS DE MEIO

SB 196 - MEIO DE PROLIFERAÇÃO LÍQUIDO LEVE FN (POR LITRO)

15	MS FeEDTA - 100x Estoque 1	10 ml
	MS Sulfato - 100x Estoque 2	10 ml
	FN Halóides Leves - 100x Estoque 3	10 ml
	FN Leve P, B, Mo - 100x Estoque 4	10 ml
	Vitaminas B5 (1 ml/l)	1,0 ml
20	2,4-D (10 mg/l concentração final)	1,0 ml
	KNO ₃	2,83 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 g
	asparagina	1,0 g
	sacarose (1%)	10 g
25	pH 5,8	

SOLUÇÕES ESTOQUE LEVE FN

Número do Estoque	1000 ml	500 ml
1 1 - MS Fe EDTA 100x Estoque		

Na ₂ EDTA*	3,724 g	1,862 g
FeSO ₄ - 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g

*Adicionar primeiro, dissolver em garrafa escura enquanto mistura

2. MS Sulfato 100x estoque

5	MgSO ₄ - 7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
	MnSO ₄ - H ₂ O	1,69 g	0,845 g
	ZnSO ₄ - 7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
	CuSO ₄ - 5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g

3 FN Halóides Leves - 100x Estoque 3

10	CaCl ₂ - 2H ₂ O	30,0 g	15,0 g
	KI	0,083 g	0,0715 g
	CoCl ₂ - 6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g

4 FN Leve P, B, Mo 100x Estoque

	KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
15	H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
	Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

MEIO SÓLIDO SB1 (POR LITRO)

1 pacote de sais MS (Gibco/ BRL - Cat. No. 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000X estoque

20 31,5 g de glicose

2 ml 2,4-D (20 mg/l concentração final)

pH 5,7

8 g de ágar TC

MEIO SÓLIDO SB199 (POR LITRO)

25 1 pacote de sais MS (Gibco/ BRL - Cat. No. 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000X estoque

30 g de sacarose

4 ml 2,4-D (40 mg/l concentração final)

pH 7,0

2 g de gelrita

MEIO SÓLIDO SB 166 (POR LITRO)

1 pacote de sais MS (Gibco/ BRL - Cat. No. 11117-066)

5 1 ml de vitaminas B5 1000X estoque

60 g de maltose

750 mg de $MgCl_2$ hexahidrato

5 g de carvão ativado

pH 5,7

10 2 g de gelrita

MEIO SÓLIDO SB 103 (POR LITRO)

1 pacote de sais MS (Gibco/ BRL - Cat. No. 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000X estoque

60 g de maltose

15 750 mg de $MgCl_2$ hexahidrato

pH 5,7

2 g de gelrita

MEIO SÓLIDO SB 71-4 (POR LITRO)

20 1 garrafa de sais sem sacarose B5 de Gamborg (Gibco/ BRL - Cat. No. 21153-036)

pH 5,7

5 g de ágar TC

ESTOQUE 2,4-D

Obter pré-preparado de Phytotech Cat. No. D 295 – concentração 1 mg/ml

25 **ESTOQUE VITAMINAS B5 (POR 100 ML)**

Armazenar alíquotas a – 20°C

10 g de mio-inositol

100 mg de ácido nicotínico

100 mg de HCl piridoxina

1 g de tiamina

Se a solução não se dissolver rapidamente, aplicar um pouco de calor através de prato de agitação quente.

5 **SB 228- HISTODIFERENCIAÇÃO DE SOJA & MATURAÇÃO (SHAM) (POR LITRO)**

	DDI H ₂ O	600 ml
	Sais Macro Leve FN para SHaM 10X	100 ml
	Micro Sais MS Micro 1000x	1 ml
	MS FeEDTA 100x	10 ml
10	CaCl 100x	6,82 ml
	Vitaminas B5 1000x	1 ml
	L-Metionina	0,149 g
	Sacarose	30 g
	Sorbitol	30 g

15 Ajuste de volume para 900 ml

pH 5,8

Autoclave

Adicionar ao meio resfriado (≤ 30 °C):

*Glutamina (concentração final 30 mM) 4% 110 ml

20 *Nota: O volume final será de 1010 ml após adição de glutamina

Visto que a glutamina se degrada relativamente rápido, pode ser preferível adicioná-la imediatamente antes de se usar o meio. O prazo de validade é de 2 semanas após a adição de glutamina, o meio base pode ser mantido por mais tempo sem a adição de glutamina.

25 **SAIS MACRO LEVE FN PARA SHAM 10X- ESTOQUE #1 (POR LITRO)**

	(NH ₄) ₂ SO ₄ (sulfato de amônio)	4,63 g
	KNO ₃ (nitrato de potássio)	28,3 g
	MgSO ₄ *7H ₂ O (sulfato de magnésio heptahidratado)	3,7 g

KH_2PO_4 (fosfato de potássio, monobásico) 1,85 g

Trazer para o volume

Autoclave

MICRO MS 1000X- ESTOQUE #2 (PARA 1 LITRO)

5 H_3BO_3 (ácido bórico) 6,2 g
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio monohidratado) 16,9 g
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinco heptahidratado) 8,6 g
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (molibdato de sódio dihidratado) 0,25 g
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado) 0,025 g
 10 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cobalto hexahidratado) 0,025 g
 KI (iodeto de potássio) 0,8300 g

Trazer para o volume

Autoclave

FEEDTA 100X- ESTOQUE #3 (POR LITRO)

15 Na_2EDTA^* (EDTA de sódio) 3,73 g
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato ferroso heptahidratado) 2,78 g

* O EDTA precisa ser completamente dissolvido antes da adição do ferro.

Trazer para o volume

A solução é fotosensível. As garrafas devem ser embrulhadas em folha de

20 alumínio para evitar contato com a luz.

Autoclave

CA 100X- ESTOQUE #4 (POR LITRO)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio dihidratado) 44 g

Trazer para o volume

25 Autoclave

VITAMINA B5 1000X- ESTOQUE #5 (POR LITRO)

Tiamina*HCl 10 g

Ácido Nicotínico 1 g

Piridoxina*HCl	1 g
Mio-inositol	100 g

Trazer para o volume

Armazenar congelado

5 **GLUTAMINA 4% - ESTOQUE #6 (POR LITRO)**

DDI água aquecida a 30°C	900 ml

L-glutamina	40 g

Adicionar gradualmente enquanto agita e aplicar um pouco de calor

Não exceder 35°C.

10 Trazer para o volume

Filtrar de maneira estéril

Armazenar congelado*

*Nota: Descongelar a 31°C em banho maria para dissolver completamente os cristais.

15 **REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA NAS PLANTAS**

Com o objetivo de se obter plantas inteiras a partir de culturas de suspensão embriogênicas, o tecido deve ser regenerado. Os embriões são amadurecidos conforme descrito acima. Após o subcultivo em meio SB130 por 3 semanas, os embriões individuais podem ser removidos dos agrupamentos e

20 selecionados para alterações em suas composições de ácido graxo, conforme descrito no Exemplo 7. Deve-se notar que qualquer fenótipo detectável, resultante da expressão dos genes de interesse, poderia ser selecionado neste estágio. Isto incluiria, mas não se limitaria a, alterações no perfil de ácido graxo, perfil e conteúdo de proteína, conteúdo de carboidrato, taxa de

25 crescimento, viabilidade, ou capacidade para o desenvolvimento normal em uma planta de soja.

Embriões individuais maduros foram dessecados colocando-os em uma pequena placa de petri vazia (35 x 10 mm), por aproximadamente 4 a

7 dias. As placas são fechadas com fita crepe (criando uma câmara com baixa umidade). Os embriões dessecados são plantados em meio SB71-4, onde eles são deixados para germinar sob as condições de cultura descritas acima. As plântulas são removidas do meio de germinação e enxaguadas completamente
5 com água e então plantadas em bandejas de 24 células Redi-Earth, cobertas com cúpulas de plástico transparente. Após duas semanas a cúpula é removida e as plantas são fortificadas por mais uma semana. Se as plântulas parecem fortes, elas são transplantadas para um vaso de 10 polegadas de Redi-Earth com até 3 plântulas por vaso. Após dez a dezesseis semanas, as
10 sementes maduras foram colhidas, quebradas e analisadas para os ácidos graxos.

EXEMPLO 7

ANÁLISE DE ÁCIDO GRAXO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS TRANSGÊNICOS DE SOJA

Embriões somáticos maduros são um bom modelo para embriões
15 zigóticos. Enquanto no estado embrionário globular na cultura líquida, embriões somáticos de soja contêm quantidades muito baixas de triacilglicerol ou proteínas de armazenamento típicas de embriões zigóticos de soja maduros. Neste estágio de desenvolvimento, a proporção de triacilglicerídios total para lipídio polar total (fosfolipídios e glicolipídios) é de aproximadamente
20 1:4, como é típico de embriões zigóticos de soja no estágio de desenvolvimento no qual a cultura embrionária somática foi iniciada. Também no estágio globular, os mRNAs para as proteínas das sementes proeminentes, a subunidade α' de β -conglucina, inibidor de tripsina 3 kunitz, e lecitina na semente estão essencialmente ausentes. Mediante transferência para meio
25 isento de hormônio para permitir diferenciação ao estágio embrionário somático de maturação, triacilglicerol torna-se a classe de lipídio mais abundante. Como também, mRNAs para subunidades α' de β -conglucina, inibidor de tripsina 3 kunitz e lecitina na semente tornam-se mensagens muito abundantes na

população de mRNA total. A partir disso, o sistema embrionário somático de soja se comporta de forma muito similar para maturação de embriões zigóticos de soja *in vivo* e é, então, um bom e rápido sistema modelo para análise dos efeitos fenotípicos da modificação da expressão gênica na via biossintética de ácido graxo (consulte publicação PCT documento WO 2002/00904, Exemplo 3). De forma mais importante, o sistema modelo é também preditivo da composição de ácido graxo de sementes para plantas derivadas de embriões transgênicos.

Um subgrupo de embriões de soja para cada evento gerado a partir da transformação para produção ou transformação de sistema modelo (conforme descrito no Exemplo 6) são colhidos da maneira a seguir. Os embriões (5 a 10 embriões) de cada evento são colhidos em frascos de CG e os metil ésteres de ácido graxo são preparados por transesterificação. Para transesterificação, 50 µl de hidróxido trimetilsulfônio (TMSH) e 0,5 ml de hexano são adicionados aos embriões em frascos de vidro e incubados por 30 min em temperatura ambiente com agitação. Metil ésteres de ácido graxo (5 µl injetado da camada de hexano) são separados e quantificados usando-se Cromatografia Gasosa Hewlett Packard 6890, ajustada com uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Cat. No. 24152, Supelco Inc.). A temperatura do forno é programada para ser mantida a 220 °C por 2,6 min, aumentando para 240 °C a 20 °C /min e então mantida por mais 2,4 min. O veículo gasoso é fornecido por um gerador de hidrogênio Whatman. Tempos de retenção são comparados àqueles para metil ésteres de padrões comercialmente disponíveis (Nu-Chek Prep, Inc). Os eventos que apresentam bom fenótipo podem ser reanalisados por CG usando-se condições idênticas, exceto a temperatura do forno sendo mantida a 150 °C por 1 min e então aumentada para 240 °C a 5 °C.

EXEMPLO 8

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO DE SOJA ALTERNADOS PARA EXPRESSÃO

DE DELTA-8 DESATURASES DE *EUGLENA ANABAENA* UTEX 373 (EAD8DES1-4)

Além dos genes, promotores, terminadores e genes cassetes descritos no presente pedido, um técnico no assunto pode apreciar que outras combinações de promotor/gene/terminador cassete possam ser sintetizadas de uma maneira similar, mas não limitada àquela descrita no presente pedido para expressão de EaD8Des3. De maneira similar, pode ser desejável expressar outros genes de PUFA (como aqueles descritos abaixo na tabela 9), para coexpressão com qualquer uma das delta-8 desaturases da presente invenção.

Por exemplo, publicações PCT documento WO 2004/071467 e documento WO 2004/071178 descrevem o isolamento de vários promotores e sequências terminadoras de transcrição para uso na expressão específica em embrião na soja. Além disso, as publicações PCT documentos WO 2004/071467, WO 2005/047479 e WO 2006/012325 descrevem a síntese de múltiplas combinações de promotor/gene/terminador cassete pela ligação de promotores individuais, genes e terminadores de transcrição juntos, em uma única combinação. Geralmente, um sítio *NotI* ladeado pelo promotor adequado (como aqueles listados, mas não limitados à tabela 7) e um terminador de transcrição (como aqueles listados, mas não limitados à tabela 8) é usado para clonar o gene desejado. Sítios *NotI* podem ser adicionados a um gene de interesse, como aqueles listados, mas não limitados à tabela 9, usando-se amplificação por PCR com oligonucleotídeos designados para introduzir sítios *NotI* nas terminações 5' e 3' do gene. O produto de PCR resultante é então digerido a *NotI* e clonado em um cassete promotor/*NotI*/terminaror adequado.

Além disso, as publicações PCT documentos WO 2004/071467, WO 2005/047479 e WO 2006/012325 descrevem a ligação adicional dos genes cassetes individuais em uma única combinação, junto com cassetes marcadores selecionáveis, a fim de obter a expressão fenotípica desejada.

Embora isto seja feito principalmente usando-se sítios de enzimas de restrição diferentes, um técnico no assunto pode apreciar que várias técnicas possam ser utilizadas para alcançar a combinação promotor/gene/terminador de transcrição desejada. Feito isso, qualquer combinação de

5 promotor/gene/terminador cassetes de transcrição específica do embrião pode ser alcançada. O técnico no assunto pode, também, apreciar que estes cassetes possam estar localizados nos fragmentos individuais de DNA ou em múltiplos fragmentos onde a coexpressão de genes é resultado da cotransformação de múltiplos fragmentos de DNA.

10

TABELA 7**PROMOTORES ESPECÍFICOS DE SEMENTES**

Promotor	Organismo	Referência do Promotor
subunidade α' de β -conglucina	soja	Beachy et al., <i>EMBO J.</i> 4:3047-3053 (1985)
inibidor tripsina de kunitz	soja	Jofuku et al., <i>Plant Cell</i> 1:1079-1093 (1989)
Anexina	soja	documento WO 2004/071467
glicina Gy1	soja	documento WO 2004/071467
albumina 2S	soja	patente US 6.177.613
legumina A1	ervilha	Rerie et al., <i>Mol. Gen. Genet.</i> 225:148-157 (1991)
subunidade β de β -conglucina	soja	documento WO 2004/071467
BD30 (também chamado P34)	soja	documento WO 2004/071467
legumina A2	ervilha	Rerie et al., <i>Mol. Gen. Genet.</i> 225:148-157 (1991)

TABELA 8**TERMINADORES DE TRANSCRIÇÃO**

Terminador de Transcrição	Organismo	Referência
faseolina 3'	feijão	documento WO 2004/071467
inibidor tripsina 3' de kunitz	soja	documento WO 2004/071467
BD30 (também chamado P34) 3'	soja	documento WO 2004/071467
legumina A2 3'	ervilha	documento WO 2004/071467
albumina 2S 3'	soja	documento WO 2004/071467

TABELA 9**GENES DA VIA BIOSINTÉTICA DE PUFA**

Gene	Organismo	Referência
delta-6 desaturase	<i>Saprolegnia diclina</i>	documento WO 2002/081668
delta-6 desaturase	<i>Mortierella alpina</i>	patentes US 5.968.809
elongase	<i>Mortierella alpina</i>	documento WO 2000/12720 patentes US 6.403.349
delta-5 desaturase	<i>Mortierella alpina</i>	patentes US 6.075.183
delta-5 desaturase	<i>Saprolegnia diclina</i>	documento WO 2002/081668
delta-5 desaturase	<i>Peridinium sp.</i>	pedido de patente US 11/748637
delta-5 desaturase	<i>Euglena gracilis</i>	pedido de patente US 11/748629
delta-15 desaturase	<i>Fusarium moniliforme</i>	documento WO 2005/047479
delta-17 desaturase	<i>Saprolegnia diclina</i>	documento WO 2002/081668
elongase	<i>Thraustochytrium aureum</i>	documento WO 2002/08401 patentes US 6.677.145
elongase	<i>Pavlova sp.</i>	Pereira <i>et al.</i> , <i>Biochem. J.</i> 384:357-366 (2004)
delta-4 desaturase	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	documento WO 2002/0900493 patentes US 7.045.683

Gene	Organismo	Referência
delta-4 desaturase	<i>Isochrysis galbana</i>	documento WO 2002/0900493 patentes US 7.045.683
delta-4 desaturase	<i>Thraustochytrium aureum</i>	documento WO 2002/0900493 patentes US 7.045.683
delta-4 desaturase	<u><i>Euglena gracilis</i></u>	pedido de patente US 10/552.127
delta-9 elongase	<i>Isochrysis galbana</i>	documento WO 2002/077213
delta-9 elongase	<i>Euglena gracilis</i>	pedido de patente US 11/601.563
delta-9 elongase	<i>Eutreptiella</i> sp. CCMP389	pedido de patente US 11/601.564
delta-8 desaturase	<i>Euglena gracilis</i>	documento WO 2000/34439 pedido de patente US 6.825.017 documento WO 2004/057001 documento WO 2006/012325
delta-8 desaturase	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Sayanova <i>et al.</i> , <i>FEBS Lett.</i> 580:1946-1952 (2006)
delta-8 desaturase	<i>Pavlova salina</i>	documento WO 2005/103253
delta-8 desaturase	<i>Pavlova lutheri</i>	pedido de patente US 11/737772
delta-8 desaturase	<i>Tetruetreptia pomquetensis</i> CCMP1491	pedido de patente US 11/876115
delta-8 desaturase	<i>Eutreptiella</i> sp. CCMP389	pedido de patente US 11/876115
delta-8 desaturase	<i>Eutreptiella cf. gymnastica</i> CCMP1594	pedido de patente US 11/876115

EXEMPLO 9

SÍNTESE DE UM GENE DE DELTA-8 DESATURASE COM OTIMIZAÇÃO DE CÓDON PARA *YARROWIA LIPOLYTICA* (EAD8S)

Resumidamente, o uso do códon do gene de delta-8 desaturase
5 (EaD8Des3; SEQ ID NO:19) de *Euglena anabaena* foi otimizado para

expressão em *Yarrowia lipolytica*, de uma maneira similar àquela descrita na publicação PCT documento WO 2004/101753. Especificamente, um gene de delta-8 elongase com otimização de códon (designado "IgD9eS", SEQ ID NO:48) foi designado com base na sequência codificadora de EaD8Des3 (SEQ ID NO:19 e 23), de acordo com o padrão de uso do códon de *Yarrowia* (publicação PCT documento WO 2004/101753), a sequência consenso ao redor do códon de iniciação de tradução "ATG", e as regras gerais de estabilidade de RNA (Guhaniyogi, G. e J. Brewer, *Gene* 265(1-2):11-23 (2001)). Além disso, para modificação do sítio de iniciação de tradução, 231 bp da região codificadora de 1260 bp foram modificados (18,3%) e 208 códons foram otimizados (49,5%). O conteúdo da CG foi reduzido de 56,8% no gene tipo selvagem (isto é, EaD8Des3) para 54,8% no gene sintético (isto é, EaD8S). Um sítio *Nco*I e sítios *Not*I foram incorporados ao redor do códon de iniciação de tradução e após o códon de parada de EaD8S (SEQ ID NO:48), respectivamente. As figuras 9A e 9B mostram uma comparação da sequência de nucleotídeos de EaD8Des3 (SEQ ID NO:19) e EaD8S (SEQ ID NO:48). O gene EaD8S com otimização de códon não alterou qualquer sequência de aminoácido de EaD8Des3 (SEQ ID NO:23). O gene EgD8S designado foi sintetizado pelo GenScript Corporation (Piscataway, NJ) e clonado no pUC57 (número de acesso no GenBank Y14837) para gerar pEgD8S (SEQ ID NO:49; figura 10).

Com base nos ensinamentos do presente pedido em relação à construção do vetor e promotores e terminadores adequados para uso em *Yarrowia lipolytica*, um técnico no assunto será capaz de construir plasmídios adicionais adequados para expressão de EaD8S (SEQ ID NO:48).

EXEMPLO 10

IDENTIFICAÇÃO DE UMA DELTA-9 ELONGASE A PARTIR DE *EUGLENA ANABAENA* UTEX

O presente exemplo descreve a identificação de delta-9 elongases a partir de uma biblioteca de cDNA UTEX 373 de *Euglena anabaena*. Este trabalho também está descrito no pedido provisório de patente US 60/911.925 (depositado em 16 de abril de 2007; número de registro legal
5 BB-1613).

CRESCIMENTO DE *EUGLENA ANABAENA* UTEX 373 E PREPARAÇÃO DE RNA

A biblioteca de cDNA amplificada eug1c foi plaqueada e as colônias foram transferidas conforme descrito no Exemplo 1. Foi feita uma sonda de DNA usando-se um gel de agarose purificado com fragmento de DNA
10 NcoI/NotI, contendo o gene da delta-9 desaturase de *Euglena gracilis*, de pKR906 (SEQ ID NO:42; Exemplo 5 e documento WO 2007/061845, publicado em 31 de maio de 2007; número de registro legal BB-1562, o conteúdo deste está incorporado ao presente pedido como referência) marcado com P³² dCTP usando-se o sistema de marcação de DNA RadPrime (Cat. No. 18428-011,
15 Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo-se as instruções do fabricante.

As colônias transferidas foram sondadas e os positivos foram identificados e confirmados, conforme descrito no Exemplo 2. O DNA plasmidial foi isolado e sequenciado exatamente conforme descrito no Exemplo 1 e as sequências foram alinhadas e comparadas usando-se Sequencher™
20 (Versão 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Desta maneira, os clones poderiam ser categorizados em um dos dois grupos distintos com base na sequência do inserto (designada EaD9Elo1 e EaD9Elo2). EaD9Elo1 também é chamado de EaD9e, mas eles não são idênticos. Os clones representativos contendo o cDNA para cada classe de sequência foram
25 escolhidos para estudos posteriores e as sequências para cada plasmídio representativo (pLF121-1 e pLF121-2) são mostradas nas SEQ ID NO:50 e SEQ ID NO:51, respectivamente. A sequência mostrada por uma linha de NNNN representa uma região da cauda poli-A que não foi sequenciada. As

sequências codificadoras para EaD9Elo1 e EaD9Elo2 são mostradas na SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:53, respectivamente. As sequências de aminoácidos correspondentes EaD9Elo1 e EaD9Elo2 são mostradas na SEQ ID NO:54 e SEQ ID NO:55, respectivamente.

5

EXEMPLO 11

CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO DE SOJA PKR1150 PARA COEXPRESSION DA DELTA-8 DESATURASE (EAD8DES3) DE EUGLENA ANABAENA UTEX 373 COM UMA DELTA-9 ELONGASE DERIVADA DE EUGLENA ANABAENA UTEX 373 (EAD9ELO1)

O presente Exemplo descreve a construção de um vetor de soja para coexpressão de EaD8Des3 com EaD9Elo1.

A fim de introduzir os sítios de restrição *NotI* e *NcoI* na extremidade 5' das sequências codificadoras e um sítio *NotI* na extremidade 3' das sequências codificadoras, EaD9Elo1 foi amplificado por PCR a partir de pLF121-1 (SEQ ID NO:50; Exemplo 10) com primers de oligonucleotídeos oEAd9el1-1 (SEQ ID NO:56) e oEAd9el1-2 (SEQ ID NO:57) usando-se DNA polimerase de alta fidelidade Phusion™ (Cat. No. F553S, Finnzymes Oy, Finlândia), seguindo-se o protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA resultantes foram clonados no vetor de clonagem pCR-Blunt® usando-se o Kit de Clonagem Zero Blunt®PCR (Invitrogen Corporation), seguindo-se o protocolo do fabricante, para produzir pKR1137 (SEQ ID NO:58).

EaD9Elo1 foi liberado do plasmídeo pKR1137 (SEQ ID NO:58) pela digestão com *NotI* e clonado no sítio *NotI* do pKR72 (SEQ ID NO:43; Exemplo 5) para produzir pKR1140 (SEQ ID NO:59).

O vetor pKR1138 (SEQ ID NO:46; Exemplo 5) foi digerido com BsiWI e o fragmento contendo EaD8Des3 foi clonado no sítio BsiWI do pKR1140 (SEQ ID NO:59) para produzir pKR1150 (SEQ ID NO:60). Uma descrição esquemática de pKR1150 é mostrada na figura 11. Na figura 11, EaD9Elo1 é chamado de EAd9elong.

EXEMPLO 12**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO DE *ARABIDOPSIS* pKR1192 PARA EXPRESSÃO DE UMA DELTA-9 ELONGASE DE *EUGLENA ANABAENA* COM UMA DELTA-8 DESATURASE DE *EUGLENA ANABAENA***

5 O fragmento *AscI* de pKR1140 (SEQ ID NO:59; Exemplo 11) foi clonado no fragmento *AscI* de pKR277 (que está descrito na publicação PCT documento WO 04/071467) para produzir pKR1173 (SEQ ID NO:61).

O cassete *Gyl/Pavelo/legA2* foi liberado do plasmídio pKR336 (descrito na Publicação PCT documento WO 04/071467; o conteúdo deste é
10 incorporado ao presente pedido como referência), pela digestão com *PstI/BamHI* e clonado no sítio *PstI/BamHI* de pKR268 (descrito na Publicação PCT documento WO 04/071467) para produzir pKR393 (SEQ ID NO:62). O gene *Pavelo* foi liberado de pKR393 (SEQ ID NO:62) pela digestão com *NotI* e o vetor foi religado a pKR407 (SEQ ID NO:63).

15 O fragmento *NotI* de pLF120-3 (SEQ ID NO:30), contendo o gene *EaD8Des3* foi clonado no sítio *NotI* do pKR407 (SEQ ID NO:63) para produzir pKR1176 (SEQ ID NO:64).

O fragmento *PstI* do pKR1176 (SEQ ID NO:64), contendo o gene *EaD8Des3* foi clonado no fragmento *SbfI* do pKR1173 (SEQ ID NO:160 61)
20 para produzir pKR1178 (SEQ ID NO:65).

O fragmento *AscI* de pKR1178 (SEQ ID NO:65), contendo *EgD9elo1* e *EaD8Des3* foi clonado no sítio *AscI* de pKR92 (que foi previamente descrito no documento WO 2007/061845, publicado em 31 de maio de 2007) para produzir pKR1195 (SEQ ID NO:66). Uma descrição esquemática de
25 pKR1192 é mostrada na figura 12. Na figura 12, *EaD9elo1* é chamado de *EaD9elong*, mas eles não são idênticos. Desta maneira, *EgD9e* foi expresso em *Arabidopsis* mediante o controle do promotor beta-conglicina de soja e *EaD8Des3* foi expresso mediante o controle do promotor glicina *Gyl* de soja.

O promotor beta-conglicinina de soja e promotor Gyl funcionam como promotores fortes específicos de semente em *Arabidopsis*.

EXEMPLO 13

ANÁLISE FUNCIONAL DE DELTA-8 DESATURASE NA SOJA

5 O presente exemplo descreve a transformação e a expressão nos embriões somáticos de pKR1152 (SEQ ID NO:47; Exemplo 5) e pKR1150 (SEQ ID NO:60; Exemplo 11).

A cultura de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foi transformada com cada um dos vetores acima e os embriões foram maturados
10 em meio líquido de histodiferenciação e maturação de soja (meio líquido SHaM; Schmidt *et al.*, *Cell Biology and Morphogenesis* 24:393 (2005)), conforme descrito no Exemplo 6 e previamente descrito na publicação PCT. documento 2007/136877, publicado em 29 de novembro de 2007 (o conteúdo deste é incorporado ao presente pedido como referência).

15 Após a maturação em meio líquido SHaM, um subgrupo de embriões de soja transformados (isto é, 5 a 6 embriões por evento) foram colhidos e analisados conforme descrito no presente pedido.

Desta maneira, aproximadamente 30 eventos transformados tanto com pKR1152 (SEQ ID NO:47; Exemplo 5; chamado Experimento MSE2136)
20 como com pKR1150 (SEQ ID NO:60; Exemplo 11; chamado MSE2130) foram analisados e os cinco eventos com a média de conteúdo mais alto de DGLA (média de 5 embriões analisados) são mostrados nas figuras 13 ou 14, respectivamente. Nas figuras 13 e 14 os ácidos graxos são identificados como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oléico), LA, ALA, EDA,
25 ERA, DGLA e ETA. As composições de ácido graxo são expressas como percentual do total de ácidos graxos (% em peso).

Nas figuras 13 e 14, a atividade de alongamento é expressa como % de alongamento de de delta-9 de ácidos graxos C18 (C18 % delta-9 elong),

calculada de acordo com a fórmula a seguir: $[(\text{produto})/(\text{substrato} + \text{produto})]*100$. Mais especificamente, a porcentagem de alongamento combinada para LA e ALA é determinada como: $[(\text{DGLA} + \text{ETA} + \text{EDA} + \text{ERA})/(\text{LA} + \text{ALA} + \text{DGLA} + \text{ETA} + \text{EDA} + \text{ERA})]*100$.

5 Nas figuras 13 e 14, o percentual de dessaturação combinada para EDA e ERA é mostrado como "C20 % delta-8 desat", determinado como: $[(\text{EDA} + \text{ERA})/(\text{DGLA} + \text{ETA} + \text{EDA} + \text{ERA})]*100$. Isto também é referido como % de dessaturação geral.

EXEMPLO 14

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SEMENTE DE *ARABIDOPSIS* TRANSFORMADA COM PKR1192 PARA EXPRESSÃO DE UMA DELTA-9 ELONGASE DE *EUGLENA ANABAENA* COM UMA DELTA-8 DESATURASE DE *EUGLENA ANABAENA* EM *ARABIDOPSIS*

Um duplo mutante *fad3/fae1* (Smith *et al.*, *Planta* 217:507-516 (2003)) de *Arabidopsis* produz sementes onde o conteúdo de ALA e ácidos
15 graxos 20:1 é menor que 2,0%. O duplo mutante *fad3/fae1* de plantas *Arabidopsis* foram transformados com pKR1192 (SEQ ID NO:66), e as plantas foram cultivadas, mantidas e as sementes foram colhidas, conforme previamente descrito no documento WO 2007/061845 (o conteúdo deste é incorporado ao presente pedido como referência).

20 A segregação de sementes T2 foi obtida a partir de 21 eventos individuais cada um e os perfis lipídicos da parte principal da semente T2 para cada evento foram obtidos por transesterificação com TMSH, cnforme descrito no presente pedido com as modificações a seguir. Para cada evento, o conteúdo equivalente a uma pequena concha de sementes (aproximadamente
25 25-50 sementes para cada concha) foi comprimido em 50 µl de TMSH em um tubo eppendorf de 1,5 ml. Após agitação em TMSH por 15 min., 400 µl de heptano foi adicionado e os tubos foram bem turbilhonados, agitados por mais 15 min e centrifugados a 13.000 x g por 1 min. Após agitação, a camada de

heptano foi removida em frascos de vidro de CG e os metil ésteres de ácido graxo foram analisados conforme descrito no presente pedido.

Os perfis lipídicos da parte principal da semente T2 para os 21 eventos são mostrados na figura 15. Os ácidos graxos são identificados como
5 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oléico), LA, ALA, 20:0 (ácido eicosanóico), 20:1 (ácido eicosenóico), EDA, DGLA, ERA e ETA e composições de ácidos graxos listadas na figura 15 são expressos como percentual em peso (% em peso) do total de ácidos graxos.

Na figura 15, o percentual de dessaturação combinada para EDA
10 e ERA é mostrado como "C20 % delta-8 desat", determinado como: $[(EDA + ERA)/(DGLA + ETA + EDA + ERA)] \times 100$. Isto também é referido como % de dessaturação geral.

REIVINDICAÇÕES

1. POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, que compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que o polipeptídeo tem pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácido, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação a uma sequência de aminoácidos conforme apresentada na SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou SEQ ID NO:24;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que a sequência de nucleotídeos tem pelo menos 80% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento BLASTN, em comparação a uma sequência de nucleotídeos conforme apresentada na SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 ou SEQ ID NO:20;

(c) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que tem atividade de delta-8 desaturase, sendo que a sequência de nucleotídeos, mediante condições estridentes, hibridiza com uma sequência de nucleotídeos conforme apresentada na SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 ou SEQ ID NO:20; ou

(d) um complemento da sequência de nucleotídeo de (a), (b) ou (c), sendo que o complemento e a sequência de nucleotídeos consistem no mesmo número de nucleotídeos e são 100% complementares.

2. POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da sequência de aminoácidos do polipeptídeo ter pelo menos 85% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação à SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou SEQ ID NO:24.

3. POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato da sequência de aminoácidos do polipeptídeo ter pelo menos 90% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação à SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou SEQ ID NO:24.

5 4. POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da sequência de aminoácidos do polipeptídeo ter pelo menos 95% de identidade de sequência, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação à SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou SEQ ID NO:24.

10 5. POLINUCLEOTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da sequência de nucleotídeos compreender SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 ou SEQ ID NO:20.

 6. POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da sequência de aminoácidos do polipeptídeo
15 compreender:

 (a) SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou SEQ ID NO:24; ou

 (b) uma sequência de aminoácidos que difere daquelas
sequências em (a) pelo menos por uma substituição conservativa de
20 aminoácido.

 7. POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da sequência de aminoácidos do polipeptídeo compreender ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 ou SEQ ID NO:24.

 8. CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, caracterizado
25 pelo fato de compreender o polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, 5, 6 ou 7, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora.

 9. CÉLULA VEGETAL, caracterizada pelo fato de compreender em seu genoma a construção de DNA recombinante, de acordo

com a reivindicação 8.

10. MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSFORMADA, caracterizado pelo fato de compreender a transformação de uma célula vegetal com pelo menos um polinucleotídeo, de acordo com a
5 reivindicação 1, 5, 6 ou 7, e regeneração de uma planta a partir da célula vegetal transformada.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato da planta ser uma planta de soja.

12. SEMENTE TRANSGÊNICA, caracterizada pelo fato de
10 compreender em seu genoma a construção recombinante, de acordo com a reivindicação 8.

13. SEMENTE TRANSGÊNICA, caracterizada pelo fato de ser obtida a partir da planta produzida pelo método, de acordo com a reivindicação 10 ou 11.

14. ÓLEO OU SUBPRODUTOS, caracterizado pelo fato de
15 serem obtidos a partir da semente, de acordo com a reivindicação 12.

15. ÓLEO OU SUBPRODUTOS, caracterizado pelo fato de serem obtidos a partir da semente, de acordo com a reivindicação 13.

16. MÉTODO PARA FABRICAR ÁCIDOS GRAXOS POLI-
20 INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, que compreende:

(a) a transformação de uma célula com a construção recombinante, de acordo com a reivindicação 8; e

(b) a seleção dessas células transformadas que produzem ácidos
25 graxos poli-insaturados de cadeia longa.

17. MÉTODO PARA PRODUZIR PELO MENOS UM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO EM UMA CÉLULA VEGETAL OLEAGINOSA, que compreende:

(a) transformação de uma célula vegetal oleaginosa com uma primeira construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica pelo menos um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora e pelo menos um

5 constructo de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em uma delta-4 desaturase, uma delta-5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17

10 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e uma elongase C_{20/22};

(b) regeneração de uma planta oleaginosa a partir da célula transformada da etapa (a); e

(c) seleção dessas sementes obtidas a partir das plantas da etapa

15 (b) que têm um nível alterado de ácidos graxos poli-insaturados em comparação ao nível nas sementes obtidas a partir de plantas oleaginosas não transformadas.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato da planta oleaginosa ser selecionada a partir do grupo que consiste

20 em soja, espécies de *Brassica*, girassol, milho, algodão, linho e cártamo.

19. PLANTA OLEAGINOSA, caracterizada pelo fato de compreender em seu genoma a construção recombinante, de acordo com a reivindicação 8.

20. PLANTA OLEAGINOSA, que compreende:

25 (a) uma primeira construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica pelo menos um polipeptídeo delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e

(b) pelo menos uma construção de DNA recombinante adicional que compreende um polinucleotídeo isolado, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora, que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em uma delta-4 desaturase, uma delta-5 desaturase, uma delta-6 desaturase, uma delta-8 desaturase, uma delta-12 desaturase, uma delta-15 desaturase, uma delta-17 desaturase, uma delta-9 desaturase, uma delta-9 elongase, uma elongase C_{14/16}, uma elongase C_{16/18}, uma elongase C_{18/20} e uma elongase C_{20/22}.

21. PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizada pelo fato da planta de semente oleaginosa ser selecionada do grupo que consiste em soja, espécies de *Brassica*, girassol, milho, algodão, linho e cártamo.

22. SEMENTE TRANSGÊNICA, caracterizada pelo fato de ser obtida a partir de planta com semente oleaginosa, de acordo com a reivindicação 18.

23. SEMENTE TRANSGÊNICA, caracterizada pelo fato de ser obtida a partir de planta com semente oleaginosa, de acordo com a reivindicação 19.

24. ÓLEO OU SUBPRODUTOS, caracterizado pelo fato de serem obtidos a partir da semente, de acordo com a reivindicação 22.

25. ÓLEO OU SUBPRODUTOS, caracterizado pelo fato de serem obtidos a partir da semente, de acordo com a reivindicação 23.

26. ÓLEO, caracterizado pelo fato de ser obtido pelo método, de acordo com a reivindicação 16 ou 17.

27. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, caracterizado pelo fato de incorporar o óleo, de acordo com a reivindicação 24.

28. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, caracterizado pelo fato de incorporar o óleo, de acordo com a reivindicação 25.

29. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, caracterizado pelo fato de incorporar o óleo, de acordo com a reivindicação 26.

30. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, que compreende a semente, de acordo com a reivindicação 22.

5 31. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, que compreende a semente, de acordo com a reivindicação 24.

32. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, caracterizado pelo fato de compreender um ingrediente derivado do processamento das sementes, de acordo com a reivindicação 22.

10 33. ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, caracterizado pelo fato de compreender um ingrediente derivado do processamento da semente, de acordo com a reivindicação 23.

34. ÓLEO OU SUBPRODUTOS, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato do subproduto ser lecitina.

15 35. ÓLEO OU SUBPRODUTOS, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato do subproduto ser lecitina.

36. MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, que tem um nível reduzido de subprodutos de ácidos graxos, cujo método compreende:

20 (a) a transformação de uma célula vegetal hospedeira com pelo menos uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica pelo menos duas delta-8 desaturases, ligado de maneira funcional a pelo menos uma sequência reguladora; e

(b) a seleção dessas células vegetais hospedeiras transformadas
25 obtidas que têm um nível reduzido de subprodutos de ácidos graxos, em comparação ao nível desses subprodutos metabólicos de ácidos graxos em uma célula hospedeira transformada tendo pelo menos um constructo de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo isolado que codifica uma

delta-8 desaturase, ligado de maneira funcional a uma sequência reguladora.

37. PLANTAS DA PROGÊNIE, caracterizada pelo fato de serem obtidas a partir da planta produzida pelo método, de acordo com a reivindicação 10 ou 11.

5 38. PLANTAS DA PROGÊNIE, caracterizada pelo fato de serem obtidas a partir da planta oleaginosa, de acordo com a reivindicação 22 ou 23.

LISTAGEM DE SEQUENCIAS

<110> E. I. du Pont de Nemours and Company

<120> Delat-8 deraturases e seu uso na produção de ácidos graxos polinsaturados

<130> BB1615

<150> 60/910831

<151> 10-04-2007

<160> 66

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 604

<212> DNA

<213> Euglena anabaena

<400> 1

gccaactttg tacaaaaaag ttggattttt tttcggccca cgatctcaca tgggtgaaaag	60
gccagcactt ccgctgaccg ttgatgggtg cacctatgat gtgtctgcct ggttgaacca	120
tcattccagg ggtgctgaca tcattgagaa ctaccgcggt cgtgatgccca ctgatgtctt	180
tatgggttatg cactctgaaa atgctgtgag taaactaaga aggatgccta tcattggaacc	240
atcatctcca ctgacgccta cgccaccgaa acccaactca gacgaaccgc aggaggattt	300
ccgcaagctc cgagatgagc tcattcgcagc aggaatgttc gacgcattcac cgatgtggta	360
cgcatataag acgctcacta cgctgggcct cggggctctc gcggtgctat tgatgacca	420
gtggcactgg tacctcgtcg gggcaatcgt gttgggcatt cacttccaac aaatgggttg	480
gttgtcgcac gatattctgcc accatcagct gttcaaggac cgatcgatca acaacgccat	540
cggcttgctt ttcgggaacg tcttgcaagg gttctctgtg acctggtgga aggacagtca	600
caac	604

<210> 2

<211> 1263

<212> DNA

<213> Euglena gracilis

<400> 2

atgaagtcaa agcgccaagc gcttcccctt acaattgatg gaacaacata tgatgtgtct	60
gcctgggtca atttccacc ttggtgggtgcg gaaattatag agaattacca aggaagggat	120
gccactgatg ctttcatggt tatgcactct caagaagcct tcgacaagct caagcgcgatg	180


```

cccaaaatca atcccagttc tgagttgccca ccccaggctg cagtgaatga agctcaagag 240
gatttccgga agctccgaga agagttgatc gcaactggca tgtttgatgc ctccccctc 300
tggtactcat acaaaatcag caccacactg ggccttgag tgctgggtta tttctgatg 360
gttcagtatc agatgtatct cattggggca gtgttgcttg ggatgcacta tcaacagatg 420
ggctggcttt ctcatgacat ttgccaccac cagactttca agaaccggaa ctggaacaac 480
ctcgtgggac tggatatttg caatggctg caaggttttt ccgtgacatg gtggaaggac 540
agacacaatg cacatcattc ggcaaccaat gttcaagggc acgaccctga tattgacaac 600
ctccccctct tagcctggtc tgaggatgac gtcacacggg cgtcaccgat ttcccgaag 660
ctcattcagt tccagcagta ctatttcttg gtcactgtga tcttggtgcg gttcatttgg 720
tgtttccaga gcgtgttgac cgtgcgagc ttgaaggaca gagataacca attctatcgc 780
tctcagtata agaaggaggc cattggcctc gccctgcact ggaccttgaa gacctgttc 840
cacttattct ttatgccag catcctcaca tcgctgttg tgtttttctg ttccggagctg 900
gttgggcgct tcggcattgc gatcgtggtg ttcattgaacc actaccact ggagaagatc 960
ggggactcag tctgggatgg ccatggattc tcggttgcc agatccatga gaccatgaac 1020
attcggcgag ggattatcac agattgggtt ttcggaggct tgaattacca gattgagcac 1080
catttgtggc cgacctccc tcgccacaac ctgacagcgg ttagctacca ggtggaacag 1140
ctgtgccaga agcacaacct gccgtatcgg aaccgctgc cccatgaagg gttggtcatc 1200
ctgctgcgct atctggcggg gttcgccgg atggcgaga agcaaccgc ggggaaggct 1260
cta 1263

```

```

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> primer específico pDonor222Eg5-1

```

```

<400> 3
gccaaactttg tacaaaaaag ttggatt

```

27

```

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> primer D8DEG3-1

```

<220>
 <221> característica misc
 <222> (7)..(7)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 4
 rttrtgncka tctttccacc a

21

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer D8DEG3-2

<220>
 <221> característica misc
 <222> (7)..(7)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 5
 rttrtgnckg tctttccacc a

21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer D8DEG3-3

<220>
 <221> característica misc
 <222> (7)..(7)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 6
 rttrtgncka tccttccacc a

21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer D8DEG3-4

<220>
 <221> caracter'sitica misc
 <222> (7)..(7)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 7
 rttrtgnckg tccttccacc a

21

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer 8-T7

<400> 8
 ggaaacagct atgaccatg 19

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer M13-28Rev

<400> 9
 gtaatacgcac tcactatagg gc 22

<210> 10
 <211> 4116
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pHD23-1

<400> 10
 cctgaattcc agcacactgg cggccggttac tagtggatcc gagctcggta ccaagcttga 60
 tgcatagctt gagtattcta acgcgtcacc taaatagctt ggcgtaatca tggatcatagc 120
 tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca 180
 taaagtgtaa agcctggggg gcctaatacga tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct 240
 cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac 300
 gcgcgggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgcg ttctcgcgc actgactcgc 360
 tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg 420
 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 480
 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 540
 agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 600
 accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta 660
 ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct 720
 gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 780

ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgcgtaa	840
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg	900
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag	960
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	1020
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	1080
cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	1140
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca	1200
cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt ttagcacgtg tcagtcctgc tctcggcca	1260
cgaagtgcac gcagttgccg gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcccc cacggtgct	1320
cgccgatctc ggtcatggcc ggcccgagg cgtcccgaa gttcgtggac acgacctcg	1380
accactcggc gtacagctcg tccaggccgc gcaccacac ccaggccagg gtgttgctcg	1440
gcaccacctg gtcctggacc gcgctgatga acagggtcac gtcgtcccg accacaccg	1500
cgaagtcgct ctccacgaag tcccgggaga acccgagccg gtcggtccag aactcgaccg	1560
ctccggcgac gtcgcgcgcg gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggtgg	1620
ccctcctcac gtgctattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca	1680
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaag taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag	1740
tgccacctga tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg	1800
aaattgtaag cgtaataat tcagaagaac tcgtcaagaa ggcatagaa ggcgatgcgc	1860
tgcgaatcgg gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcccgcca	1920
agctcttcag caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc	1980
agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatttt ccacatgat attcggcaag	2040
caggcatcgc catgggtcac gacgagatcc tcgccgtcgg gcatgctcgc cttgagcctg	2100
gcgaacagtt cggctggcgc gagccccga tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca	2160
agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat	2220
gggcaggtag ccgatcaag cgtatgcagc cgccgcattg catcagccat gatggatact	2280
ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc	2340
agccagtccc ttcccgttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc	2400
gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg tcttgagtt cattcagggc accggacagg	2460

tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcgggcatca	2520
gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc	2580
ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatactca tctgtctct	2640
tgatcagagc ttgatccctt gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt	2700
actttgcagg gcttcccaac cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt	2760
gctgtccata aaaccgcca gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc	2820
tttctctttg cgcttgcggt ttcccttgct cagatagccc agtagctgac attcatccgg	2880
ggtcagcacc gtttctgcgg actggctttc tacgtgaaaa ggatctaggt gaagatcctt	2940
tttgataatc tcatgcctga cttttatatt cccagaaca tcaggttaat ggcgtttttg	3000
atgtcatttt cgcggtggct gagatcagcc acttcttccc cgataacgga gaccggcaca	3060
ctggccatat cgggtggtcat catgcgccag ctttcatccc cgatatgcac caccgggtaa	3120
agttcacggg agactttatc tgacagcaga cgtgcactgg ccagggggat caccatccgt	3180
cgccccggcg tgtcaataat atcaactctgt acatccacaa acagacgata acggctctct	3240
cttttatagg tgtaaacctt aaactgccgt acgtataggc tgcgcaactg ttgggaaggg	3300
cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg	3360
cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt	3420
gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggccctc tagatgcatg ctcgagcggc	3480
cgccagtgtg atggatatct gcagaattca gggccaactt tgtacaaaaa agttggattt	3540
tttttcggcc cacgatctca catggtgaaa aggccagcac ttccgctgac cgttgatggg	3600
gtcacctatg atgtgtctgc ctggttgaac catcatccag ggggtgctga catcattgag	3660
aactaccgcg gtcgtgatgc cactgatgtc tttatggtta tgcaactctga aaatgctgtg	3720
agtaaaactaa gaaggatgcc tatcatggaa ccatcatctc cactgacgcc tacgccaccg	3780
aaacccaact cagacgaacc gcaggaggat ttccgcaagc tccgagatga gctcatcgca	3840
gcaggaatgt tcgacgcatc accgatgtgg tacgcatata agacgctcac tacgtgggc	3900
ctcgggggtc tcgcggtgct attgatgacc cagtggcact ggtacctcgt cggggcaatc	3960
gtgttgggca ttcacttcca acaaatgggt tggttgtcgc acgatatctg ccaccatcag	4020
ctgttcaagg accgatcgat caacaacgcc atcggcttgc ttttcgggaa cgtcttgcaa	4080
gggttctctg tgacctggtg gaaggacagt cacaac	4116

<210> 11
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> *Euglena gracilis*

<400> 11

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

Thr Leu Lys Ala Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile Leu Thr
 275 280 285
 Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe Gly Ile
 290 295 300
 Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile Gly Asp
 305 310 315 320
 Pro Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His Glu Thr
 325 330 335
 Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly Gly Leu
 340 345 350
 Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg His Asn
 355 360 365
 Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys His Asn
 370 375 380
 Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile Leu Leu
 385 390 395 400
 Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro Ala Gly
 405 410 415

Lys Ala Leu

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer EaD8seq-1

<400> 12
 ccaccatcag ctgttcaagg

20

<210> 13
 <211> 4363
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pLF118-1

<220>
 <221> característica misc
 <222> (4311)..(4350)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 13
 gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt tggtgcaacg aacagggtcac 60

tatcagtc	caa aataaa	tca ttattt	gcc tccagc	tgat atcccc	tata gtgagtc	cgta	120
ttacatg	gtc atagct	gttt cctggc	cagct ctggcc	ctgt tctcaaa	atc tctgat	gtta	180
cattgc	acaa gataaaa	ata tatcat	catg ttagaaaa	ac tcatcg	agca tcaaat	gaaa	240
ctgca	attta ttcatat	cag gattat	caat accat	atttt tgaaaa	agcc gtttct	gtaa	300
tgaagg	agaa aactcac	cg ggcag	ttcca taggat	ggca agatc	cctggt atcgg	tctgc	360
gattcc	gact cgtcca	acat caatac	aacc tatta	atttc ccctcg	tcaa aaata	agggt	420
atcaagt	gag aaatcac	cat gagg	tacgac tgaat	ccggt gaga	atggca aaagc	ttatg	480
catttct	tttc cagact	tgtt caac	caggcc gccatt	acgc tcgtc	atcaa aatc	actcgc	540
atcaacc	aaaa ccgtt	attca ttcgt	gattg cgctg	agcg agac	gaaata cgcg	atcgt	600
gttaaa	agga caatt	acaaa cagga	atcga atgca	accgg cgcag	gaaca ctgcc	agcgc	660
atcaaca	ata ttttc	acctg aatc	aggata ttctt	ctaata acctg	ggaatg ctgtt	tttccc	720
ggggat	cgca gtggt	gagta accat	gcac atcag	gagta cggat	aaaat gctt	gatggt	780
cggaag	aggc ataa	attccg tcagc	cagtt tagt	ctgacc atct	catctg taac	atcatt	840
ggcaac	gcta ccttt	gccat gtttc	agaaa caact	ctggc gcac	tgggct tcc	atacaa	900
tcgat	agatt gtgc	acctg attg	cccgac attat	cgca gccat	tttat acc	catata	960
atcag	catcc atgtt	ggaat ttaat	cgcg cctcg	agca gacgt	tttccc gttg	aatatg	1020
gctcat	agat ctttt	ctcca tca	ctgatag ggag	tggtaa aata	actcca tca	atgatag	1080
agtgt	caaca acatg	accaa aatcc	cttaa cgtg	agttac gcg	tattaat tgc	gttg	1140
tcactg	ccccg ctttc	cagtc gggaa	acctg tcgtg	ccagc tgc	attaatg aat	cggccaa	1200
cgcgcg	ggga gaggc	ggttt gcgt	attggg cgct	cttccg cttc	ctgct cact	gactcg	1260
ctgcg	ctcg tcgtt	cggct gcgg	cagcg gtat	cagctc actc	aaaggc gg	taatac	1320
ttatcc	acag aatc	agggga taac	gcagga aga	acatgt gag	caaaaag cc	agcaaaa	1380
gccagga	acc gtaaa	aaggc cgcgt	tgtctg gcgt	ttttcc atag	gtccg cccc	cctgac	1440
gagcat	caca aaa	atcgac ctca	agtcag aggt	ggcgaa accc	gacag act	tataa	1500
taccagg	cgt tttccc	ctgg aagct	ccctc gtgc	gctctc ctgt	tccgac cctg	ccgctt	1560
accgg	atacc tgtcc	gcctt tctcc	cttcg gga	agcgtg cgct	tttctca atg	ctcacgc	1620
tgtagg	tatc tcag	ttcgg gtagg	tcgt cgct	ccaagc tggg	ctgtgt gcac	gaaccc	1680
cccgtt	cagc ccgac	cgtg cgc	cttatcc ggta	actatc gtct	tgagtc ca	acccggt	1740

agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggttaaca	ggattagcag	agcgaggtat	1800
gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggttacac	tagaagaaca	1860
gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	1920
tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	ggtggttttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	1980
acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	2040
cagggaaacga	cgcgtaaccg	tagccaggaa	gagtttgtag	aaacgcaaaa	aggccatccg	2100
tcaggatggc	cttctgctta	gtttgatgcc	tggcagttta	tggcgggctg	cctgcccggc	2160
accctccggg	ccgttgcttc	acaacgttca	aatccgctcc	cggcggattt	gtcctactca	2220
ggagagcggt	caccgacaaa	caacagataa	aacgaaaggc	ccagtcttcc	gactgagcct	2280
ttcgttttat	ttgatgcctg	gcagttccct	actctcgctg	taacgctagc	atggatgttt	2340
tcccagtcac	gacgttgtaa	aacgacggcc	agtcttaagc	tcgggccccca	aataatgatt	2400
ttattttgac	tgatagtgac	ctgttcgttg	caacaaattg	atgagcaatg	cttttttata	2460
atgccaaactt	tgtacaaaaa	agttggtatt	ttttttcggc	ccacgatctc	acatggtgaa	2520
aaggccagca	cttccgctga	ccgttgatgg	tgtcacctat	gatgtgtctg	cctggttgaa	2580
ccatcatcca	gggggtgctg	acatcattga	gaactaccgc	ggtcgtgatg	ccactgatgt	2640
ctttatgggt	atgcactctg	aaaatgctgt	gagtaaacta	agaaggatgc	ctatcatgga	2700
accatcatct	ccactgacgc	ctacgccacc	gaaacccaac	tcagacgaac	cgcaggagga	2760
tttccgcaag	ctccgagatg	agctcatcgc	agcaggaatg	ttcgacgcac	caccgatgtg	2820
gtacgcatat	aagacgctca	ctacgctggg	cctcgggggc	ctcgcggtgc	tattgatgac	2880
ccagtggcac	tggtacctcg	tcggggcaat	cgtgttgggc	attcacttcc	aacaaatggg	2940
ttggttgctg	cacgatatct	gccaccatca	gctgttcaag	gaccgatcga	tcaacaacgc	3000
catcggcttg	cttttcggga	acgtcttgca	agggttctct	gtgacctggt	ggaaggacag	3060
gcacaatgca	caccactccg	ccaccaacgt	gcaaggccac	gaccccgaca	ttgacaacct	3120
gccgctgctg	gcatggtcca	aggaggacgt	ggagagggcc	ggcccgttct	cacggcgcat	3180
gatcaagtac	cagcaatact	acttcttctt	catctgtgcc	ctcctgaggt	tcatctggtg	3240
cttcagagc	atccacacag	ccaagggcct	gaaggatcgc	agcaaccagt	actaccgcag	3300
gcagtacgag	aaagagagcg	tgggcctggc	cctccactgg	ggcctgaagg	cgttggttcta	3360
ctacttttat	atgccaaact	tcttgaccgg	actcatggtg	tttttcgtgt	ccgagttgct	3420

```

tgggggcttc ggcacgcga tcgtggtgtt catgaaccac taccctctgg agaagatcca 3480
ggactcgggtg tgggacggcc acggcttttg cgccggccag attcacgaaa cgatgaacgt 3540
ccagcgggga ctcgtcacgg actggttctt cgggtgggtg aattacaaa tcgagcacca 3600
cctgtggccg acgtgcccc ggcacaacct gacggcggcc agcatcaaag tggagcagtt 3660
gtgcaagaag cacaacttgc cgtatcgag cccccaatg ctggaggggg tgggcatcct 3720
gatcagctac ctgggcacct ttgccgcgt ggtggcaaag gccgacaagg cgtaagtgc 3780
atggcacgc tcaggactct gatagttggg ctgacgcttt ggtgtcatc ccttgccct 3840
tcatatcacc tctggccga ctcggattct ctctggagct ctaacctgtt caatgtggac 3900
tgctacacat atgagttcct cggatctctg gggaacagcc tttggaagac tcggcattcc 3960
tttatgcttg gaaggcttga gacctcttct gcaggactca aggcaaccct cctcagtgtc 4020
gggaaagagt atttgcttc gcctgacct gctatactc acccaacatg cgctgtggaa 4080
ttaatgatca ttgttaaagt ttggtgcgat ttctgattgt gcgcaaattg tgcggaggcg 4140
cggcacacac gttctctcc gccatcaca gtccaaggtc aaatttcaa ctctaatac 4200
catgatgggc cacagctttg cacactatct ctggcagagc tgcaagaaac tcgccacagt 4260
gagttttgag agatgttcag tgctgcgcat ttgatcggca ttgtggcctt nnnnnnnnnn 4320
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn acccaacttt ctt 4363

```

```

<210> 14
<211> 4307
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo pLF118-2

```

```

<220>
<221> característica misc
<222> (4255)..(4294)
<223> n é a, c, g, ou t

```

```

<400> 14
gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg aacaggtcac 60

tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat atcccctata gtgagtcgta 120

ttacatggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccggtg tctcaaaatc tctgatgtta 180

cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa 240

ctgcaattta tcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa 300

```

tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcgggtctgc	360
gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggtt	420
atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg	480
catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc	540
atcaacccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgc	600
gttaaaagga caattacaaa caggaatoga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc	660
atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc	720
ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt	780
cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt	840
ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatacaa	900
tcgatagatt gtgcacctg attgcccagc attatcgca gccatttat acccatataa	960
atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg	1020
gctcatagat cttttctcca tcaactgatag ggagtggtaa aataactcca tcaatgatag	1080
agtgtcaaca acatgaccaa aatcccttaa cgtgagttac gcgtattaat tgcgttgcg	1140
tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa	1200
cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg	1260
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	1320
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	1380
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac	1440
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	1500
taccaggcgt tttcccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt	1560
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc	1620
tgtaggatc tcagttcgggt gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc	1680
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	1740
agacaogact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgagggtat	1800
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggttacac tagaagaaca	1860
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct	1920
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt	1980

acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	2040
cagggaaacga	cgcgtaccgc	tagccaggaa	gagttttag	aaacgcaaaa	aggccatccg	2100
tcaggatggc	cttctgctta	gtttgatgcc	tggcagttta	tggcgggcgt	cctgcccgcc	2160
accctccggg	ccgttgcttc	acaacgttca	aatccgctcc	cggcggattt	gtcctactca	2220
ggagagcgtt	caccgacaaa	caacagataa	aacgaaaggc	ccagtcttcc	gactgagcct	2280
ttcgttttat	ttgatgcctg	gcagttccct	actctcgcgt	taacgctagc	atggatgttt	2340
tcccagtcac	gacgttgtaa	aacgacggcc	agtcttaagc	tcgggccccca	aataatgatt	2400
ttattttgac	tgatagtgac	ctgttcgttg	caacaaattg	atgagcaatg	cttttttata	2460
atgccaaactt	tgtacaaaaa	agttggattt	tttttcggcc	cacgatctca	catggtgaaa	2520
aggccagcac	ttccgctgac	cgttgatggg	gtcacctatg	atgtgtctgc	ctggttgaac	2580
catcatccag	ggggtgctga	catcattgag	aactaccgcg	gtcgtgatgc	cactgatgtc	2640
tttatggtta	tgactctga	aaatgctgtg	agtaaactaa	gaaggatgcc	tatcatggaa	2700
ccatcatctc	cactgacgcc	tacgccaccg	aaacccaact	cagacgaacc	gcaggaggat	2760
ttccgcaagc	tccgagatga	gctcatcgca	gcaggaatgt	tcgacgcac	accgatgtgg	2820
tacgcatata	agacgctcag	tacgctgggc	ctcgggggtcc	tcgcggtgct	attgatgacc	2880
cagtggcact	ggtacctcgt	cggggcaatc	gtgttgggca	ttcacttcca	acaaatgggt	2940
tggttgtcgc	acgatatctg	ccaccatcag	ctgttcaagg	accgatcgat	caacaacgcc	3000
atcggcttgc	ttttcgggaa	cgtcttgcaa	gggttctctg	tgacctgggtg	gaaggacagg	3060
cacaatgcac	accactccgc	caccaacgtg	caaggccacg	accccgacat	tgacaacctg	3120
ccgtgctgg	catggtccaa	ggaggacgtg	gagagggccg	gcccgttctc	acggcggatt	3180
atcaagtacc	agcaatacta	cttcttcttc	atctgtgccc	tcctgaggtt	catctggtgc	3240
ttccagagca	tccacacagc	cacgggcctg	aaggatcgca	gcaaccagta	ctaccgcagg	3300
cagtacgaga	aagagagcgt	gggcctggcc	ctccactggg	gcctgaaggc	gttgttctac	3360
tacttttata	tgccaagctt	cttgaccgga	ctcatggtgt	ttttcgtgtc	cgagttgctt	3420
gggggcttcg	gcatcgccat	cgtggtgttc	atgaaccact	acccctgga	gaagatccag	3480
gactcgggtg	gggacggcca	cggcttttgc	gccggccaga	ttcacgaaac	gatgaacgtc	3540
cagcggggac	tcgtcacgga	ctggttcttc	ggtgggctga	attaccaa	cgagcaccac	3600
ctgtggccga	cgctgccccg	gcacaacctg	acggcggcca	gcatcaaagt	ggagcagttg	3660

```

tgcaagaagc acaacttgcc gtatcgcagc cccccaatgc tggaggggggt gggcatcctg 3720
atcagctacc tgggcacctt tgcccgcatg gtggcaaagg ccgacaaggc gtaagtgaca 3780
tggcaccgct caggactctg atagttgggc tgacgctttg gttgtcatcc cttgcccctt 3840
catatcacct ctggccctac tcggattctc tctggagctc taacctgttc aatgtggact 3900
gctacacata tgagttcctc ggatctctgg ggaacagcct ttggaagact cggcattcct 3960
ttatgcttgg aaggcttgag acctcttctg caggactcaa ggcaaccctc ctcagtgtcg 4020
ggaaagagta tttgccttcg gctgacctg ctatacctca cccaacatgc gtcgtggaat 4080
taatgatcat tgtaagagt ttggtgcatg ttctgattgt gcgcaaattg tgcggaggcg 4140
cggcacacac gttctcctcc ggccatcaca gtccaaggctc aaatttccaa ctctaatac 4200
catgatgggc cacagctttg cacactatct ctggcagagc tgcaagaaac tcgcnnnnnn 4260
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnacccaa ctttctt 4307

```

```

<210> 15
<211> 4307
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo pLF118-3

```

```

<220>
<221> característica misc
<222> (4255)..(4294)
<223> n é a, c, g, ou t

```

```

<400> 15
gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg aacagggtcac 60
tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat atcccctata gtgagtcgta 120
ttacatggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccgtg totcaaaatc tctgatgtta 180
cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa 240
ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa 300
tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcgggtctgc 360
gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt 420
atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg 480
catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcaactgc 540
atcaaccaa cggttattca ttcgtgattg cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgct 600

```

gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc	660
atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc	720
ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt	780
cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt	840
ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatataa	900
tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc attatcgca gccatttat acccatataa	960
atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg	1020
gctcatagat cttttctcca tcaactgatag ggagtggtaa aataactcca tcaatgatag	1080
agtgtcaaca acatgaccaa aatcccttaa cgtgagttac gcgtattaat tgcgttgccg	1140
tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcgcccaa	1200
cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgtcttccg cttcctcgct cactgactcg	1260
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	1320
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	1380
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac	1440
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	1500
taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt	1560
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc	1620
tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgtccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc	1680
ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	1740
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat	1800
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggttacac tagaagaaca	1860
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct	1920
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt	1980
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct	2040
cagggaacga cgcgtaccgc tagccaggaa gagttttag aaacgcaaaa aggccatccg	2100
tcaggatggc cttctgctta gttgatgcc tggcagttta tggcgggct cctgcccgcc	2160
accctccggg ccgttgcttc acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca	2220
ggagagcggt caccgacaaa caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct	2280

ttcgttttat ttgatgcctg gcagttccct actctcgctg taacgctagc atggatgttt	2340
tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtcttaagc tcgggccccca aataatgatt	2400
ttattttgac tgatagtgac ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg cttttttata	2460
atgccaaactt tgtacaaaaa agttggctat tttttttcgg cccacgatct cacatggtga	2520
aaaggccagc acttccgctg accgttgatg gtgtcaccta tgatgtgtct gcctgggtga	2580
accatcatcc aggggggtgct gacatcattg agaactaccg cggtcgtgat gccactgatg	2640
tctttatggt tatgcaactct gaaaatgctg tgagtaaaact aagaaggatg cctatcatgg	2700
aaccatcatc tccactgacg cctacgccac cgaaacccaa ctgagacgaa ccgcaggagg	2760
atttccgcaa gctccgagat gagctcatcg cagcaggaat gttcgacgca tcaccgatgt	2820
ggtagcgata taagacgctc agtacgctgg gcctcggggc cctcgcggtg ctattgatga	2880
cccagtgcca ctggtacctc gtcggggcaa tcgtgttggg cattcaactc caacaaatgg	2940
gttggttgtc gcacgatatc tgccaccatc agctgttcaa ggaccgatcg atcaacaacg	3000
ccatcggett gcttttcggg aacgtcttgc aagggttctc tgtgacctgg tggaaggaca	3060
ggcacaatgc acaccactcc gccaccaacg tgcaaggcca cgaccccgac attgacaacc	3120
tgccgctgct ggcatggtcc aaggaggacg tggagagggc cggcccgttc tcacggcgga	3180
tgatcaagta ccagcaatac tactttctct tcactctgtc cctcctgagg ttcatctggt	3240
gcttccagag catccacaca gccacgggcc tgaaggatcg cagcaaccag tactaccgca	3300
ggcagtacga gaaagagagc gtgggcctgg ccctccactg gggcctgaag gcgttgttct	3360
actactttta tatgccaagc ttcttgaccg gactcatggt gtttttcgtg tccgagttgc	3420
ttgggggctt cggcatcgcc atcgtggtgt tcatgaacca ctacccctg gagaagatcc	3480
aggactcggg gtgggacggc cacggctttt gcgccggcca gattcacgaa acgatgaacg	3540
tccagcgggg actcgtcacg gactggttct tcggtgggct gaattaccaa atcgagcacc	3600
acctgtggcc gacgctgcc cggcacaacc tgacggcggc cagcatcaaa gtggagcagt	3660
tgtgcaagaa gcacaacttg ccgtatcgca gcccccaat gctggagggg gtgggcatcc	3720
tgatcagcta cctgggcacc ttgcccgc tgggtggcaaa ggccgacaag gcgtaagtga	3780
catggcaccg ctcaggactc tgatagttgg gctgacgctt tggttgtcat cccttgcccc	3840
ttcatatcac ctctggccct actcggattc tctctagctc taacctgttc aatgtggact	3900
gctacacata tgagttcctc ggatctctgg ggaacagcct ttggaagact cggcattcct	3960

```

ttatgcttgg aaggcttgag acctcttctg caggactcaa ggcaaccctc ctcagtgtcg 4020
ggaaagagta tttgccttcg gcctgacctg ctataacctca cccaacatgc gtcgtggaat 4080
taatgatcat tgtaagagt ttggtgcatg ttctgattgt gcgcaaattg tgcggaggcg 4140
cggcacacac gttctcctcc ggccatcaca gtccaaggtc aaatttccaa ctctaatacac 4200
catgatgggc cacagctttg cacactatct ctggcagagc tgcaagaaac tcgcnnnnnn 4260
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnacccaa ctttctt 4307

```

```

<210> 16
<211> 4297
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmideo pLF118-4

```

```

<220>
<221> característica misc
<222> (4245)..(4284)
<223> n é a, c, g, ou t

```

```

<400> 16
gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg aacagggtcac 60
tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat atccctata gtgagtcgta 120
ttacatgggc atagctgttt cctggcagct ctggcccggt tctcaaaatc tctgatgtta 180
cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa 240
ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa 300
tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcgggtctgc 360
gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtaaa aaataagggtt 420
atcaagtgag aaatcaccat gaggtagcgc tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg 480
catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc 540
atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgct 600
gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc 660
atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc 720
ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt 780
cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt 840
ggcaacgcta cttttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatataa 900

```


tcgatagatt	gtcgcacctg	attgccccgac	attatcgcgga	gcccatttat	acccatataa	960
atcagcatcc	atgttggaat	ttaatcgcg	cctcgagcaa	gacgtttccc	gttgaatatg	1020
gctcatagat	cttttctcca	tactgatag	ggagtggtaa	aataactcca	tcaatgatag	1080
agtgtcaaca	acatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagttac	gcgtattaat	tgcgttgcg	1140
tactgcccc	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	1200
cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgctcttccg	cttcctcgct	actgactcg	1260
ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	1320
ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaaag	ccagcaaaaag	1380
gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	1440
gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	1500
taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	1560
accggatacc	tgctccgctt	tctcccttcg	ggaagcggtg	cgctttctca	atgctcacgc	1620
tgtaggtatc	tcagttcgg	gtaggtcggt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	1680
cccgttcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caacccggta	1740
agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggtat	1800
gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggttacac	tagaagaaca	1860
gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	1920
tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	ggtgggtttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	1980
acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	2040
caggggaacga	cgcgtaccgc	tagccaggaa	gagttttag	aaacgcaaaa	aggccatccg	2100
tcaggatggc	cttctgctta	gtttgatgcc	tggcagttta	tggcgggct	cctgcccgcc	2160
accctccggg	ccgttgcttc	acaacgttca	aatccgctcc	cggcggattt	gtcctactca	2220
ggagagcggt	caccgacaaa	caacagataa	aacgaaaggc	ccagtcttcc	gactgagcct	2280
ttcgttttat	ttgatgcctg	gcagttccct	actctcgct	taacgctagc	atggatgttt	2340
tcccagtcac	gacgttgtaa	aacgacggcc	agtcttaagc	tcgggcccc	aataatgatt	2400
ttattttgac	tgatagtgac	ctgttcggtg	caacaaattg	atgagcaatg	cttttttata	2460
atgccaaactt	tgtacaaaaa	agttgggttc	aggcccacga	tctcacatgg	tgaaaaaggcc	2520
agcaattccg	ctgaccgttg	atggtgtcac	ctatgatgtg	tctgcctggt	tgaaccatca	2580

tccagggggt gctgacatca ttgagaacta ccgcggtcgt gatgccactg atgtctttat	2640
ggttatgcac tctgaaaatg ctgtgagtaa actaagaagg atgcctatca tggaaccatc	2700
atctccactg acgcctacgc caccgaaacc caactcagac gaaccgcagg aggatttccg	2760
caagctccga gatgagctca tcgcagcagg aatgttcgac gcatcaccga tgtggtacgc	2820
atataagacg ctcagtacgc tgggcctcgg ggtcctcgcg gtgctattga tgaccacagt	2880
gcactggtac ctgcgcgggg caatcgtggt gggcattcac ttccaacaaa tgggttggtt	2940
gtcgcacgat atctgccacc atcagctggt caaggaccga tcgatcaaca acgccatcgg	3000
cttgcttttc gggaacgtct tgcaagggtt ctctgtgacc tggtggaagg acaggcacia	3060
tgcacaccac tccgccacca acgtgcaagg ccacgacccc gacattgaca acctgccgct	3120
gctggcatgg tccaaggagg acgtggagag ggccggcccg ttctcacggc ggatgatcaa	3180
gtaccagcaa tactacttct tcttcatctg tgccctcctg aggttcatct ggtgcttcca	3240
gagcatccac acagccaagg gcctgaagga tcgcagcaac cagtactacc gcaggcagta	3300
cgagaaagag agcgtggggc tggccctcca ctggggcctg aaggcgttgt tctactactt	3360
ttatatgcca agcttcttga ccggactcat ggtgtttttc gtgtccgagt tgcttggggg	3420
cttcggcatc gccatcgtgg tgttcatgaa ccactacccc ctggagaaga tccaggactc	3480
ggtgtgggac ggccacggct tttgcgccgg ccagattcac gaaacgatga acgtccagcg	3540
gggactcgtc acggactggt tcttcggtgg gctgaattac caaatcgagc accacctgtg	3600
gccgacgctg ccccggcaca acctgacggc ggccagcatc aaagtggagc agttgtgcaa	3660
gaagcacaac ttgccgtatc gcagcccccc aatgctggag ggggtgggca tcctgatcag	3720
ctacctgggc acctttgccc gcatggtggc aaaggccgac aaggcgtaag tgacatggca	3780
ccgctcagga ctctgatagt tgggctgacg ctttggttgt catcccttgc cccttcatat	3840
cacctctggc ccgactcgga ttctctctgg agctctaacc tgttcaatgt ggactgctac	3900
acatatgagt tcctcggatc tcgggggaac agcctttgga agactcggca ttcttttatg	3960
cttggaaggc ttgagacctc ttctgcagga ctcaaggcaa ccctcctcag tgcgggaaa	4020
gagtatttgc cttcggcctg acctgctata cctcacccaa catgcgtcgt ggaattaatg	4080
atcatcggtta agagtttggg gcgatttctg attgtgcgca aattgtgcgg aggcgcggca	4140
cacacgttct cctccagcca tcacagtcca aggtcaaatt tccaactcta atcaccatga	4200
tgggccacag ctttgcacac tatttctggc agagctgcaa gaaannnnnn nnnnnnnnn	4260

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnacccaa ctttctt

4297

<210> 17

<211> 1260

<212> DNA

<213> Euglena anabaena

<400> 17

atggtgaaaa ggccagcact tccgctgacc gttgatggtg tcacctatga tgtgtctgcc	60
tggttgaacc atcatccagg ggggtgctgac atcattgaga actaccgcgg tcgtgatgcc	120
actgatgtct ttatggttat gcaacttgaa aatgctgtga gtaaaactaag aaggatgcct	180
atcatggaac catcatctcc actgacgcct acgccaccga aacccaactc agacgaaccg	240
caggaggatt tccgcaagct ccgagatgag ctcatcgag caggaatgtt cgacgcacatca	300
ccgatgtggt acgcatataa gacgctcact acgctgggcc tcggggtcct cgcggtgcta	360
ttgatgacct agtggcactg gtacctcgtc ggggcaatcg tgttgggcat tcaattccaa	420
caaattgggtt ggtgtcgca cgatatctgc caccatcagc tgttcaagga ccgatcgatc	480
aacaacgcca tcggcttgct ttccgggaac gtcttgcaag ggttctctgt gacctggtgg	540
aaggacaggc acaatgcaca ccaactccgc accaacgtgc aaggccacga ccccgacatt	600
gacaacctgc cgctgctggc atggtccaag gaggacgtgg agagggccgg cccgttctca	660
cggcggatga tcaagtacca gcaatactac ttcttcttca tctgtgccct cctgaggttc	720
atctggtgct tccagagcat ccacacagcc aagggcctga aggatcgag caaccagtac	780
taccgcaggc agtacgagaa agagagcgtg ggcctggccc tccactgggg cctgaaggcg	840
ttgttctact acttttatat gccaaacttc ttgaccggac tcatggtgtt ttctgtgtcc	900
gagttgcttg ggggcttcgg catcgccatc gtggtgttca tgaaccacta ccccttgag	960
aagatccagg actcgggtgtg ggacggccac ggcttttgcg ccggccagat tcacgaaacg	1020
atgaacgtcc agcggggact cgtcacggac tggttcttcg gtgggctgaa ttaccaaadc	1080
gagcaccacc tgtggccgac gctgccccgg cacaacctga cggcggccag catcaaagtg	1140
gagcagttgt gcaagaagca caacttgccg tatcgagcc cccaatgct ggaggggggtg	1200
ggcatcctga tcagctacct gggcaccttt gcccgcatgg tggcaaaggc cgacaaggcg	1260

<210> 18

<211> 1260

<212> DNA

<213> Euglena anabaena

<400> 18

```

atggtgaaaa ggccagcact tccgctgacc gttgatggtg tcacctatga tgtgtctgcc      60
tggttgaacc atcatccagg ggggtgctgac atcattgaga actaccgcgg tcgtgatgcc      120
actgatgtct ttatggttat gcaactctgaa aatgctgtga gtaaaactaag aaggatgcct      180
atcatggaac catcatctcc actgacgcct acgccaccga aaccaactc agacgaaccg      240
caggaggatt tccgcaagct ccgagatgag ctcatcgag caggaatgtt cgacgcatca      300
ccgatgtggt acgcatataa gacgctcagt acgctgggcc tcggggtcct cgcggtgcta      360
ttgatgaccc agtggcactg gtacctcgtc ggggcaatcg tgttgggcat tcaattccaa      420
caaatgggtt ggttgtcgca cgatatctgc caccatcagc tgttcaagga ccgatcgatc      480
aacaacgcca tcggcttgtt ttccgggaac gtcttgcaag ggttctctgt gacctggtgg      540
aaggacaggc acaatgcaca ccaactccgc accaacgtgc aaggccacga ccccgacatt      600
gacaacctgc cgctgctggc atggtccaag gaggacgtgg agagggccgg ccggttctca      660
cggcggatta tcaagtacca gcaatactac ttcttcttca tctgtgccct cctgaggttc      720
atctggtgct tccagagcat ccacacagcc acgggcctga aggatcgag caaccagtac      780
taccgcaggc agtacgagaa agagagcgtg ggcctggccc tccactgggg cctgaaggcg      840
ttgttctact acttttatat gccaaacttc ttgaccggac tcatggtgtt ttctgtgtcc      900
gagttgcttg ggggcttcgg catcgccatc gtggtgttca tgaaccacta cccctggag      960
aagatccagg actcgggtgtg ggacggccac ggcttttgcg ccggccagat tcacgaaacg     1020
atgaacgtcc agcggggact cgtcacggac tggttcttcg gtgggctgaa ttaccaaadc     1080
gagcaccacc tgtggccgac gctgccccgg cacaacctga cggcggccag catcaaagtg     1140
gagcagttgt gcaagaagca caacttgccg tatcgagcc cccaatgct ggaggggggtg     1200
ggcatcctga tcagctacct gggcaccttt gcccgcatgg tggcaaaggc cgacaaggcg     1260

```

<210> 19

<211> 1260

<212> DNA

<213> Euglena anabaena

<400> 19

```

atggtgaaaa ggccagcact tccgctgacc gttgatggtg tcacctatga tgtgtctgcc      60
tggttgaacc atcatccagg ggggtgctgac atcattgaga actaccgcgg tcgtgatgcc      120
actgatgtct ttatggttat gcaactctgaa aatgctgtga gtaaaactaag aaggatgcct      180
atcatggaac catcatctcc actgacgcct acgccaccga aaccaactc agacgaaccg      240

```

caggaggatt tccgcaagct ccgagatgag ctcatcgag caggaatgtt cgacgcatca 300
 ccgatgtggt acgcatataa gacgctcagt acgctgggcc tcggggtcct cgcggtgcta 360
 ttgatgacct agtggcactg gtacctcgtc ggggcaatcg tgttgggcat tcaattccaa 420
 caaatgggtt ggttgctgca cgatatctgc caccatcagc tgttcaagga ccgatcgatc 480
 aacaacgcca tcggcttgct ttctgggaac gtcttgcaag ggttctctgt gacctggtgg 540
 aaggacaggc acaatgcaca ccaactccgc accaacgtgc aaggccacga ccccgacatt 600
 gacaacctgc cgctgctggc atgggtccaag gaggacgtgg agagggccgg cccgttctca 660
 cggcggatga tcaagtacca gcaatactac ttcttcttca tctgtgccct cctgaggttc 720
 atctggtgct tccagagcat ccacacagcc acgggcctga aggatcgag caaccagtac 780
 taccgcaggc agtacgagaa agagagcgtg ggccctggccc tccactgggg cctgaaggcg 840
 ttgttctact acttttataat gccaaacttc ttgaccggac tcatggtgtt ttctgtgtcc 900
 gagttgcttg ggggcttcgg catcgccatc gtggtgttca tgaaccacta cccctggag 960
 aagatccagg actcgggtgtg ggacggccac ggcttttgcg ccggccagat tcacgaaacg 1020
 atgaacgtcc agcggggact cgtcacggac tggttcttcg gtgggctgaa ttaccaaadc 1080
 gagcaccacc tgtggccgac gctgccccgg cacaacctga cggcggccag catcaaagt 1140
 gagcagttgt gcaagaagca caacttgccg tatcgagcc cccaatgct ggaggggggtg 1200
 ggcacacctga tcagctacct gggcaccttt gcccgcatgg tggcaaaggc cgacaaggcg 1260

 <210> 20
 <211> 1260
 <212> DNA
 <213> *Euglena anabaena*

 <400> 20
 atggtgaaaa ggccagcact tccgctgacc gttgatggtg tcacctatga tgtgtctgcc 60
 tggttgaacc atcatccagg ggggtgctgac atcattgaga actaccgcgg tcgtgatgcc 120
 actgatgtct ttatggttat gcactctgaa aatgctgtga gtaaaactaag aaggatgcct 180
 atcatggaac catcatctcc actgacgcct acgccaccga aaccaactc agacgaaccg 240
 caggaggatt tccgcaagct ccgagatgag ctcatcgag caggaatgtt cgacgcatca 300
 ccgatgtggt acgcatataa gacgctcagt acgctgggcc tcggggtcct cgcggtgcta 360
 ttgatgacct agtggcactg gtacctcgtc ggggcaatcg tgttgggcat tcaattccaa 420
 caaatgggtt ggttgctgca cgatatctgc caccatcagc tgttcaagga ccgatcgatc 480

aacaacgcca tcggcttgct ttctgggaac gtcttgcaag ggttctctgt gacctggtgg 540
aaggacaggc acaatgcaca ccactccgcc accaacgtgc aaggccacga ccccgacatt 600
gacaacctgc cgctgctggc atgggtccaag gaggacgtgg agagggccgg cccgttctca 660
cggcgatga tcaagtacca gcaatactac ttcttcttca tctgtgccct cctgaggttc 720
atctggtgct tccagagcat ccacacagcc aagggcctga aggatcgcag caaccagtac 780
taccgcaggc agtacgagaa agagagcgtg ggccctggccc tccactgggg cctgaaggcg 840
ttgttctact acttttatat gccaaacctc ttgaccggac tcatggtgtt ttctgtgtcc 900
gagttgcttg ggggcttcgg catcgccatc gtggtgttca tgaaccacta cccctggag 960
aagatccagg actcgggtgtg ggacggccac ggcttttgcg ccggccagat tcacgaaacg 1020
atgaacgtcc agcggggact cgtcacggac tggttcttcg gtgggctgaa ttaccaaadc 1080
gagcaccacc tgtggccgac gctgccccgg cacaacctga cggcggccag catcaaagtg 1140
gagcagttgt gcaagaagca caacttgccg tatcgagcc ccccaatgct ggaggggggtg 1200
ggcatcctga tcagctacct gggcaccttt gccgcgatgg tggcaaaggc cgacaaggcg 1260

<210> 21

<211> 420

<212> PRT

<213> Euglena anabaena

<400> 21

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

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

<210> 22
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Euglena anabaena

<400> 22

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

Ala Leu His Trp Gly Leu Lys Ala Leu Phe Tyr Tyr Phe Tyr Met Pro
 275 280 285

Ser Phe Leu Thr Gly Leu Met Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Leu Gly
 290 295 300

Gly Phe Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu
 305 310 315 320

Lys Ile Gln Asp Ser Val Trp Asp Gly His Gly Phe Cys Ala Gly Gln
 325 330 335

Ile His Glu Thr Met Asn Val Gln Arg Gly Leu Val Thr Asp Trp Phe
 340 345 350

Phe Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu
 355 360 365

Pro Arg His Asn Leu Thr Ala Ala Ser Ile Lys Val Glu Gln Leu Cys
 370 375 380

Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Arg Ser Pro Pro Met Leu Glu Gly Val
 385 390 395 400

Gly Ile Leu Ile Ser Tyr Leu Gly Thr Phe Ala Arg Met Val Ala Lys
 405 410 415

Ala Asp Lys Ala
 420

<210> 23
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Euglena anabaena

<400> 23

Met Val Lys Arg Pro Ala Leu Pro Leu Thr Val Asp Gly Val Thr Tyr
 1 5 10 15

Asp Val Ser Ala Trp Leu Asn His His Pro Gly Gly Ala Asp Ile Ile
 20 25 30

Glu Asn Tyr Arg Gly Arg Asp Ala Thr Asp Val Phe Met Val Met His
 35 40 45

Ser Glu Asn Ala Val Ser Lys Leu Arg Arg Met Pro Ile Met Glu Pro
 50 55 60

Ser Ser Pro Leu Thr Pro Thr Pro Pro Lys Pro Asn Ser Asp Glu Pro
 65 70 75 80

Gln Glu Asp Phe Arg Lys Leu Arg Asp Glu Leu Ile Ala Ala Gly Met
 85 90 95

Phe Asp Ala Ser Pro Met Trp Tyr Ala Tyr Lys Thr Leu Ser Thr Leu
 100 105 110

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

Ala Asp Lys Ala
420

<210> 24
<211> 420
<212> PRT
<213> Euglena anabaena

<400> 24

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

[illegible]

<210>	25
<211>	421
<212>	PRT
<213>	Euglena gracilis
<400>	25

Met	Lys	Ser	Lys	Arg	Gln	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Thr	Thr
1				5					10					15	
Tyr	Asp	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Asn	Phe	His	Pro	Gly	Gly	Ala	Glu	Ile
			20					25					30		
Ile	Glu	Asn	Tyr	Gln	Gly	Arg	Asp	Ala	Thr	Asp	Ala	Phe	Met	Val	Met
		35					40					45			
His	Ser	Gln	Glu	Ala	Phe	Asp	Lys	Leu	Lys	Arg	Met	Pro	Lys	Ile	Asn
	50					55					60				
Pro	Ser	Ser	Glu	Leu	Pro	Pro	Gln	Ala	Ala	Val	Asn	Glu	Ala	Gln	Glu
65					70					75					80
Asp	Phe	Arg	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Phe	Asp
				85					90					95	

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

Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro
 405 410 415

Ala Gly Lys Ala Leu
 420

<210> 26
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotídeo EaD8-5

<400> 26
 gcggccgcac catggtgaaa aggccagcac ttcc 34

<210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotídeo EaD8-3

<400> 27
 gcggccgctt acgccttgct ggcctttgcc 30

<210> 28
 <211> 4794
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pLF120-1

<400> 28
 cctgaattcc agcacttg cgccggttac tagtggatcc gagctcggta ccaagcttga 60
 tgcatagctt gagtattcta acgcgtcacc taaatagctt ggcgtaatca tggcatagc 120
 tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca 180
 taaagtgtaa agcctggggg gcctaatact tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct 240
 cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac 300
 gcgcgggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgcg ttcctcgctc actgactcgc 360
 tgcgctcggg cgttcggctg cgccgagcgg taccagctca ctcaaaggcg gtaatacggg 420
 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 480
 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 540
 agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 600

accaggcggtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	660
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	720
gtaggatatct cagttcgggtg taggtcgttc gtcceaagct gggctgtgtg cacgaacccc	780
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa	840
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	900
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag	960
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	1020
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta	1080
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	1140
agtggaacga aaactcacgt taagggatct tggctatgag attatcaaaa aggatcttca	1200
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttagcacgtg tcagtcctgc tctcggcca	1260
cgaagtgcac gcagttgccg gccgggtcgc gcagggcgaa ctcccgcccc cagggctgct	1320
cgccgatctc ggtcatggcc ggcccggagg cgtcccggaa gttcgtggac acgacctcgc	1380
accactcggc gtacagctcg tccaggccgc gcaccacac ccaggccagg gtgttgctcg	1440
gcaccacctg gtcttgacc gcgctgatga acagggtcac gtcgtcccgg accacaccgg	1500
cgaagtcgtc ctccacgaag tccggggaga acccgagccg gtcgggtccag aactcgaccg	1560
ctccggcgac gtcgcgcgcg gtgagcaccg gaacggcact ggtcaacttg gccatggtgg	1620
ccctctcac gtgctattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca	1680
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag	1740
tgccacctga tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg	1800
aaattgtaag cgttaataat tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc	1860
tgcgaatcgg gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgccgcca	1920
agctcttcag caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccaccccc	1980
agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatttt ccaccatgat attcggaag	2040
caggcatcgc catgggtcac gacgagatcc tcgccgtcgg gcatgctcgc cttgagcctg	2100
gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca	2160
agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat	2220
gggcaggtag ccggatcaag cgtatgcagc cgccgcattg catcagccat gatggatact	2280

ttctcggcag gagcaaggtg agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gccaatagc	2340
agccagtccc ttcccgttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc	2400
gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg tcttgagtt cattcagggc accggacagg	2460
tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcata	2520
gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc	2580
ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatcctca tcctgtctct	2640
tgatcagagc ttgatccccct gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt	2700
actttgcagg gcttcccaac cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt	2760
gctgtccata aaaccgcca gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc	2820
tttctctttg cgcttgcggt ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg	2880
ggtcagcacc gtttctgcgg actggctttc tacgtgaaaa ggatctaggt gaagatcctt	2940
tttgataatc tcatgcctga catttatatt cccagaaca tcaggttaat ggcgtttttg	3000
atgtcatttt cgcggtggct gagatcagcc acttcttccc cgataacgga gaccggcaca	3060
ctggccatat cggtggtcat catgcgccag ctttcatccc cgatatgcac caccgggtaa	3120
agttcacggg agactttatc tgacagcaga cgtgcaactg ccagggggat caccatccgt	3180
cgccccggcg tgtcaataat atcactctgt acatccacaa acagacgata acggctctct	3240
cttttatagg tgtaaacctt aaactgccgt acgtataggc tgcgcaactg ttgggaaggg	3300
cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg	3360
cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt	3420
gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggcctc tagatgcatg ctcgagcggc	3480
cgccagtgtg atggatatct gcagaattca gggcggccgc accatggtga aaaggccagc	3540
acttccgtg accgttgatg gtgtcaccta tgatgtgtct gcctggttga accatcatcc	3600
agggggtgct gacatcattg agaactaccg cggctcgtgat gccactgatg tctttatggt	3660
tatgcaactc gaaaatgctg tgagtaaaact aagaaggatg cctatcatgg aaccatcatc	3720
tcactgacg cctacgccac cgaaacccaa ctacagacgaa ccgcaggagg atttccgcaa	3780
gtccgagat gagctcatcg cagcaggaat gtccgacgca tcaccgatgt ggtacgcata	3840
taagacgctc actacgtgg gcctcggggc cctcgcggtg ctattgatga ccagtgggca	3900
ctggtacctc gtcggggcaa tcgtgttggg cattcaactc caacaaatgg gttggtgtc	3960


```

gcacgatatc tgccaccatc agctgttcaa ggaccgatcg atcaacaacg ccatcggcctt 4020
gcttttcggg aacgtcttgc aagggttctc tgtgacctgg tggaggaca ggcacaatgc 4080
acaccactcc gccaccaacg tgcaaggcca cgaccccgac attgacaacc tgccgctgct 4140
ggcatggtcc aaggaggacg tggagagggc cgccccgttc tcacggcgga tgatcaagta 4200
ccagcaatac tactttcttct tcatctgtgc cctcctgagg ttcattctggt gcttccagag 4260
catccacaca gccaaagggc tgaaggatcg cagcaaccag tactaccgca ggcagtacga 4320
gaaagagagc gtgggcctgg cctccactg gggcctgaag gcgttggtct actactttta 4380
tatgccaaagc ttcttgaccg gactcatggt gtttttcgtg tccgagttgc ttgggggctt 4440
cggcatcgcc atcgtggtgt tcatgaacca ctacccctg gagaagatcc aggactcggc 4500
gtgggacggc cacggctttt gcgccggcca gattcacgaa acgatgaacg tccagcgggg 4560
actcgtcacg gactggttct tcggtgggct gaattaccaa atcgagcacc acctgtggcc 4620
gacgctgccc cggcacaacc tgacggcggc cagcatcaaa gtggagcagt tgtgcaagaa 4680
gcacaacttg ccgtatcgca gcccccaat gctggagggg gtgggcatcc tgatcagcta 4740
cctgggcacc ttgcccgc tggtggaag ggccgacaag gcgtaagcgg ccgc 4794

```

<210> 29

<211> 4794

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmideo pLF120-2

<400> 29

```

ttgtaatacg actcactata gggcgaattg ggccctctag atgcatgctc gagcggccgc 60
cagtgtgatg gatatctgca gaattcaggc ctgaattcca gcacactggc ggccgttact 120
agtggatccg agctcgttac caagcttgat gcatagcttg agtattctaa cgcgtcacct 180
aaatagcttg gcgtaatcat ggcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac 240
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaagagt 300
gagctaactc acattaattg cggtgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 360
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattggcg 420
ctttccgct tctcgtca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 480
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 540
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cggtgctggc 600

```

gtttttccat aggetccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag	660
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccoctggaa gtcacctcgt	720
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg	780
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg	840
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg	900
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac	960
tggttaacagg attagcagag cgagggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg	1020
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt	1080
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg	1140
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	1200
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt	1260
ggtcagtaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt	1320
tagcacgtgt cagtctgct cctcgccac gaagtgcacg cagttgccgg ccgggtcgcg	1380
cagggcgaac tcccgcctcc acggtgctc gccgatctcg gtcattggccg gcccgaggcg	1440
gtcccgaag ttcgtggaca cgacctccga cactcggcg tacagctcgt ccaggccgcg	1500
caccacacc caggccaggg tgttgccgg caccacctgg tcctggaccg cgctgatgaa	1560
cagggtcacg tcgtcccga ccacaccggc gaagtcgtcc tcacgaagt cccgggagaa	1620
cccgagccgg tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgctgcgcg tgagcaccgg	1680
aacggcactg gtcaacttgg ccatgggtggc cctcctcacg tgctattatt gaagcattta	1740
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	1800
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgat gcggtgtgaa atacgcaca	1860
gatgcgtaag gagaaaatac cgcatacagga aattgtaagc gttaataatt cagaagaact	1920
cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca	1980
cgaggaagcg gtcagcccat tcgcccga gctcttcacg aatatcacgg gtagccaacg	2040
ctatgtcctg atagcgggtc gccacaccca gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc	2100
ggccattttc caccatgata ttcggcaagc aggcacgccc atgggtcacg acgagatcct	2160
cgcgctcggg catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg agcccctgat	2220
gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgt	2280

cgatgcgatg tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc	2340
gccgcattgc atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga	2400
gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt	2460
cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt	2520
cttgcagttc attcagggca ccggacaggt cggctctgac aaaaagaacc gggcgcccct	2580
gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gccagtcac	2640
agccgaatag cctctccacc caagcggcgcg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa	2700
tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt gatcagagct tgatcccctg cgccatcaga	2760
tccttggcgg caagaaagcc atccagttta ctttgcaggg cttcccaacc ttaccagagg	2820
gcgccccagc tggcaattcc ggttcgcttg ctgtccataa aaccgcccag tctagctatc	2880
gccatgtaag cccactgcaa gctacctgct ttctctttgc gcttgcgttt tcccttgtec	2940
agatagccca gtagctgaca ttcatccggg gtcagcaccg tttctgcgga ctggctttct	3000
acgtgaaaag gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgcctgac atttatattc	3060
cccagaacat caggttaatg gcgtttttga tgtcattttc gcggtggctg agatcagcca	3120
cttcttcccc gataacggag accggcacac tggccatata ggtggtcatc atgcgccagc	3180
tttcatcccc gatatgcacc accgggtaaa gttcacggga gactttatct gacagcagac	3240
gtgcactggc cagggggatc accatccgtc gccccggcgt gtcaataata tcaactctga	3300
catccacaaa cagacgataa cggctctctc ttttataggt gtaaacctta aactgccgta	3360
cgtataggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtgcg ggctcttcg ctattacgcc	3420
agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc	3480
agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg aagcggccgc accatggtga aaaggccagc	3540
acttcgctg accgttgatg gtgtcaccta tgatgtgtct gcctggtga accatcatcc	3600
agggggtgct gacatcattg agaactaccg cggctcgtgat gccactgatg tctttatggt	3660
tatgcaactc gaaaatgctg tgagtaaaact aagaaggatg cctatcatgg aaccatcatc	3720
tccactgacg cctacgccac cgaaacccaa ctcagacgaa ccgcaggagg atttccgcaa	3780
gctccgagat gagctcatcg cagcaggaat gttcgacgca tcaccgatgt ggtacgcata	3840
taagacgctc agtacgctgg gcctcggggt cctcgcggtg ctattgatga ccagtgggca	3900
ctggtacctc gtcggggcaa tcgtgttggg cattcacttc caacaaatgg gttggttgtc	3960

gcacgatatc tgccaccatc agctgttcaa ggaccgatcg atcaacaacg ccatcggctt 4020
gcttttcggg aacgtcttgc aagggttctc tgtgacctgg tggaaggaca ggcacaatgc 4080
acaccactcc gccaccaacg tgcaaggcca cgaccccgac attgacaacc tgccgctgct 4140
ggcatggtcc aaggaggacg tggagagggc cggcccgttc tcacggcgga ttatcaagta 4200
ccagcaatac tactttcttct tcatctgtgc cctcctgagg ttcatctggt gcttccagag 4260
catccacaca gccacggggc tgaaggatcg cagcaaccag tactaccgca ggcagtacga 4320
gaaagagagc gtgggcctgg ccctccactg gggcctgaag gcgttgttct actactttta 4380
tatgccaaagc ttcttgaccg gactcatggt gtttttcgtg tccgagttgc ttgggggctt 4440
cggcatcgcc atcgtggtgt tcatgaacca ctacccctg gagaagatcc aggactcggc 4500
gtgggacggc cacggctttt gcgcgggcca gattcacgaa acgatgaacg tccagcgggg 4560
actcgtcacg gactggttct tcggtgggct gaattaccaa atcgagcacc acctgtggcc 4620
gacgctgcc cggcacaacc tgacggcggc cagcatcaaa gtggagcagt tgtgcaagaa 4680
gcacaacttg ccgtatcgca gcccccaat gctggagggg gtgggcatcc tgatcagcta 4740
cctgggcacc tttgcccgca tgggtggcaaa ggccgacaag gcgtaagcgg ccgc 4794

<210> 30

<211> 4794

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Pasmídeo pLF120-3

<400> 30

ttgtaatacg actcactata gggcgaattg ggccctctag atgcatgctc gagcggccgc 60
cagtgtgatg gatattctga gaattcaggc ctgaattcca gcacactggc ggccggttact 120
agtggatccg agctcgttac caagcttgat gcatagcttg agtattctaa cgcgtcacct 180
aaatagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac 240
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatagagt 300
gagctaactc acattaattg cgttcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 360
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 420
ctcttcogct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc 480
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 540
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 600

gtttttccat aggetccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag	660
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gtcacctcgt	720
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg	780
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg	840
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg	900
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac	960
tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg	1020
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt	1080
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg	1140
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	1200
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt	1260
ggtcagtaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt	1320
tagcacgtgt cagtcctgct cctcggccac gaagtgcacg cagttgccgg ccgggtcgcg	1380
cagggcgaac tcccgcccc acggctgctc gccgatctcg gtcattggccg gcccggaaggc	1440
gtcccgaag ttcgtggaca cgacctccga ccactcggcg tacagctcgt ccaggcccg	1500
caccacacc caggccaggg tgttgccgg caccacctgg tcctggaccg cgctgatgaa	1560
cagggtcacg tcgtcccga ccacaccggc gaagtcgtcc tccacgaagt cccgggagaa	1620
cccgagccgg tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcgcgg tgagcaccgg	1680
aacggcactg gtcaacttgg ccatggtggc cctcctcacg tgctattatt gaagcattta	1740
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	1800
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgat gcggtgtgaa ataccgcaca	1860
gatgcgtaag gagaaaatac cgcatacagga aattgtaagc gttaataatt cagaagaact	1920
cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca	1980
cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg	2040
ctatgtcctg atagcgggcc gccacacca gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc	2100
ggccattttc caccatgata ttcggcaagc aggcacgcc atgggtcacg acgagatcct	2160
cgccgtcggg catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg agcccctgat	2220
gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct	2280

cgatgcgatg tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc	2340
gccgcattgc atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga	2400
gacctgccc cggcacttcg cccaatagca gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt	2460
cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt	2520
cttgcagttc attcagggca ccggacaggt cggctctgac aaaaagaacc gggcgcccct	2580
gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gccagtcac	2640
agccgaatag cctctccacc caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa	2700
tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt gatcagagct tgatcccctg cgccatcaga	2760
tccttggcgg caagaaagcc atccagttta ctttgcaggg ctcccaacc ttaccagagg	2820
gcgccccagc tggcaattcc ggttcgcttg ctgtccataa aaccgcccag tctagctatc	2880
gcatgtaag cccactgcaa gctacctgct ttctctttgc gcttgcggtt tcccttgtec	2940
agatagccca gtagctgaca ttcatccggg gtcagcaccg tttctgcgga ctggctttct	3000
acgtgaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgcctgac atttatatc	3060
cccagaacat caggttaatg gcgtttttga tgtcattttc gcggtggctg agatcagcca	3120
cttcttcccc gataacggag accggcacac tggccatata ggtggtcac atgcgccagc	3180
tttcatcccc gatatgcacc accgggtaaa gttcacggga gactttatct gacagcagac	3240
gtgcactggc cagggggatc accatccgtc gcccggcgt gtcaataata tcaactctgta	3300
catccacaaa cagacgataa cggtctcttc ttttataggt gtaaacctta aactgccgta	3360
cgtataggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc	3420
agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc	3480
agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg aagcggccgc accatggtga aaaggccagc	3540
acttcgctg accgttgatg gtgtcaccta tgatgtgtct gcctggttga accatcatcc	3600
agggggtgct gacatcattg agaactaccg cggctcgtgat gccactgatg tctttatggt	3660
tatgcaactc gaaaatgctg tgagtaaaact aagaaggatg cctatcatgg aaccatcatc	3720
tccactgacg cctacgccac cgaaacccaa ctacagacgaa ccgcaggagg atttccgcaa	3780
gctccgagat gagctcatcg cagcaggaat gttcgacgca tcaccgatgt ggtacgcata	3840
taagacgctc agtacgctgg gcctcggggc cctcgcggtg ctattgatga ccagtgggca	3900
ctggtacctc gtcggggcaa tcgtgttggtg cattcacttc caacaaatgg gttggttgct	3960

```

gcacgatatc tgccaccatc agctgttcaa ggaccgatcg atcaacaacg ccatcggcctt 4020
gcttttcggg aacgtcttgc aagggttctc tgtgacctgg tggaggaca ggcacaatgc 4080
acaccactcc gccaccaacg tgcaaggcca cgaccccgac attgacaacc tgccgctgct 4140
ggcatggtcc aaggaggacg tggagagggc cgccccgttc tcacggcgga tgatcaagta 4200
ccagcaatac tactttcttct tcatctgtgc cctcctgagg ttcatttggg gcttccagag 4260
catccacaca gccacggggc tgaaggatcg cagcaaccag tactaccgca ggcagtacga 4320
gaaagagagc gtgggccttg cctccactg gggcctgaag gcgttgttct actactttta 4380
tatgccaaagc ttcttgaccg gactcatggt gtttttcgtg tccgagttgc ttggggggctt 4440
cggcatcgcc atcgtggtgt tcatgaacca ctacccctg gagaagatcc aggactcggg 4500
gtgggacggc cacggctttt gcgccggcca gattcacgaa acgatgaacg tccagcgggg 4560
actcgtcacg gactggttct tcgggtgggt gaattaccaa atcgagcacc acctgtggcc 4620
gacgtgccc cggcacaacc tgacggcggc cagcatcaaa gtggagcagt tgtgcaagaa 4680
gcacaacttg ccgtatcgca gcccccaat gctggagggg gtgggcatcc tgatcagcta 4740
cctgggcacc ttgcccgc tggtggaag ggccgacaag gcgtaagcgg ccgc 4794

```

```

<210> 31
<211> 4794
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo pLF120-4

```

```

<400> 31
ttgtaatacg actcactata gggcgaattg ggccctctag atgcatgctc gagcggccgc 60
cagtgtgatg gatattctga gaattcaggc ctgaattcca gcacactggc ggccgttact 120
agtggatccg agctcgttac caagcttgat gcatagcttg agtattctaa cgcgtcacct 180
aaatagcttg gcgtaatcat ggatcatagct gtttctctgtg tgaaattgtt atccgctcac 240
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatagagt 300
gagctaactc acattaattg cggtgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 360
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag 420
ctcttccgct tctcgtctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg 480
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 540
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cggttgcctggc 600

```

gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag	660
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt	720
gcgctctcct gttccgaccc tgcgcgttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg	780
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg	840
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg	900
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac	960
tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg	1020
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt	1080
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg	1140
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	1200
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt	1260
ggtcagtaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt	1320
tagcacgtgt cagtcctgct cctcggccac gaagtgcacg cagttgccgg ccgggtcgcg	1380
cagggcgaac tcccgcccc acggctgctc gccgatctcg gtcattggccg gcccgaggcg	1440
gtccccgaag ttcgtggaca cgacctccga ccactcggcg tacagctcgt ccaggccgcg	1500
caccacacc caggccaggg tgttgccgg caccacctgg tcctggaccg cgctgatgaa	1560
cagggtcacg tcgtcccga ccacaccggc gaagtcgtcc tccacgaagt cccgggagaa	1620
cccgagccgg tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcgcg tgagcaccgg	1680
aacggcactg gtcaacttgg ccatggtggc cctcctcacg tgctattatt gaagcattta	1740
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	1800
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgat gcggtgtgaa ataccgcaca	1860
gatgcgtaag gagaaaatac cgcatacagga aattgtaagc gttaataatt cagaagaact	1920
cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca	1980
cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg	2040
ctatgtcctg atagcgggcc gccacaccca gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc	2100
ggccattttc caccatgata ttcggcaagc aggcacgccc atgggtcacg acgagatcct	2160
cgcgctcggg catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg agcccctgat	2220
gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct	2280

cgatgcgatg	tttcgcttgg	tggtcgaatg	ggcaggtagc	cggatcaagc	gtatgcagcc	2340
gccgcattgc	atcagccatg	atggatactt	tctcggcagg	agcaāgggtga	gatgacagga	2400
gacctgccc	cggcacttcg	cccaatagca	gccagtcctt	tcccgtttca	gtgacaacgt	2460
cgagcacagc	tgcgcaagga	acgcccgtcg	tggccagcca	cgatagccgc	gctgcctcgt	2520
cttgcagttc	attcagggca	cgggacaggt	cggctcttgac	aaaaagaacc	gggcgcccct	2580
gcgctgacag	ccggaacacg	gcggcatcag	agcagccgat	tgtctgttgt	gccagtcct	2640
agccgaatag	cctctccacc	caagcggcgc	gagaacctgc	gtgcaatcca	tcttgttcaa	2700
tcatgcgaaa	cgatcctcat	cctgtctctt	gatcagagct	tgatcccctg	cgccatcaga	2760
tccttggcgg	caagaaagcc	atccagttta	ctttgcaggg	cttcccaacc	ttaccagagg	2820
gcgccccagc	tggcaattcc	ggttcgcttg	ctgtccataa	aaccgcccag	tctagctatc	2880
gcatgtaag	ccactgcaa	gctacctgct	ttctctttgc	gcttgcgttt	tccttggtcc	2940
agatagccca	gtagctgaca	ttcatccggg	gtcagcaccg	tttctgcgga	ctggctttct	3000
acgtgaaaag	gatctagggt	aagatccttt	ttgataatct	catgcctgac	atttatattc	3060
cccagaacat	caggttaatg	gcgtttttga	tgtcattttc	gcggtggctg	agatcagcca	3120
cttcttcccc	gataacggag	accggcacac	tggccatata	ggtggtcata	atgcgccagc	3180
tttcatcccc	gatatgcacc	accgggtaaa	gttcacggga	gactttatct	gacagcagac	3240
gtgcactggc	cagggggatc	accatccgtc	gccccggcgt	gtcaataata	tcactctgta	3300
catccacaaa	cagacgataa	cggctctctc	ttttataggt	gtaaacctta	aactgccgta	3360
cgtataggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	gatcggtgcg	ggcctcttcg	ctattacgcc	3420
agctggcgaa	aggggggatgt	gctgcaaggc	gattaagttg	ggtaacgcca	gggttttccc	3480
agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtg	aagcggccgc	accatggtga	aaaggccagc	3540
acttcgctg	accgttgatg	gtgtcaccta	tgatgtgtct	gcctggttga	accatcatcc	3600
aggggggtgct	gacatcattg	agaactaccg	cggctcgtgat	gccactgatg	tctttatggt	3660
tatgcactct	gaaaatgctg	tgagtaaaact	aagaaggatg	cctatcatgg	aaccatcatc	3720
tccactgacg	cctacgccac	cgaaacccaa	ctcagacgaa	ccgcaggagg	atttccgcaa	3780
gctccgagat	gagctcatcg	cagcaggaat	gttcgacgca	tcaccgatgt	ggtacgcata	3840
taagacgctc	agtacgctgg	gcctcggggg	cctcgcgggtg	ctattgatga	cccagtggca	3900
ctggtacctc	gtcggggcaa	tcgtgttggtg	cattcacttc	caacaaatgg	gttggttgct	3960

gcacgatatc tgccaccatc agctgttcaa ggaccgatcg atcaacaacg ccatcggcctt 4020
gcttttcggg aacgtcttgc aagggttctc tgtgacctgg tggaaggaca ggcacaatgc 4080
acaccactcc gccaccaacg tgcaaggcca cgaccccgac attgacaacc tgccgctgct 4140
ggcatggctc aaggaggacg tggagagggc cggcccgctt tcacggcgga tgatcaagta 4200
ccagcaatac tactttcttct tcatctgtgc cctcctgagg ttcattctggt gcttccagag 4260
catccacaca gccacgggcc tgaaggatcg cagcaaccag tactaccgca ggcagtacga 4320
gaaagagagc gtgggcctgg ccctccactg gggcctgaag gcgttggtct actactttta 4380
tatgccaaagc ttcttgaccg gactcatggt gtttttcgtg tccgagttgc ttgggggctt 4440
cggcatcgcc atcgtggtgt tcatgaacca ctacccctg gagaagatcc aggactcggc 4500
gtgggacggc cacggctttt gcgccggcca gattcacgaa acgatgaacg tccagcgggg 4560
actcgtcacg gactggttct tcggtgggct gaattaccaa atcgagcacc acctgtggcc 4620
gacgctgcc cggcacaacc tgacggcggc cagcatcaaa gtggagcagt tgtgcaagaa 4680
gcacaacttg ccgtatcgca gcccccaat gctggagggg gtgggcatcc tgatcagcta 4740
cctgggcacc tttgcccgca tgggtggcaaa ggccgacaag gcgtaagcgg ccgc 4794

<210> 32
<211> 9472
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Plasmídeo pDMW263

<400> 32
catggcatgg atggtacgtc ctgtagaaac cccaaccggt gaaatcaaaa aactcgacgg 60
cctgtgggca ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaaag 120
cgcgttacaa gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgac agttcgccga 180
tgcagatatt cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcaagtct ttataccgaa 240
aggttgggca ggccagcgta tcgtgctgcg tttogatgcg gtcactcatt acggcaaaagt 300
gtgggtcaat aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga 360
tgtcacgccc tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga 420
actgaactgg cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa 480
gcagtcttac ttccatgatt tctttaacta tgccgggac catcgcagcg taatgctcta 540
caccacgccg aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg 600

taaccacgcg	tctgttgact	ggcaggtggt	ggccaatggt	gatgtcagcg	ttgaactgcg	660
tgatgcggat	caacaggtgg	ttgcaactgg	acaaggcact	agcgggactt	tgcaagtggg	720
gaatccgcac	ctctggcaac	cgggtgaagg	ttatctctat	gaactgtgcg	tcacagccaa	780
aagccagaca	gagtgtgata	tctacccgct	tcgcgtcggc	atccggtcag	tggcagtgaa	840
gggccaacag	ttcctgatta	accacaaacc	gttctacttt	actggctttg	gtcgtcatga	900
agatgcggac	ttacgtggca	aaggattcga	taacgtgctg	atggtgcacg	accacgcatt	960
aatggactgg	attggggcca	actcctaccg	tacctcgcac	tacccttacg	ctgaagagat	1020
gctcgactgg	gcagatgaac	atggcatcgt	ggtgattgat	gaaactgctg	ctgtcggctt	1080
taacctctct	ttaggcattg	gtttcgaagc	gggcaacaag	ccgaaagaac	tgtacagcga	1140
agaggcagtc	aacggggaaa	ctcagcaagc	gcacttacag	gcgattaaag	agctgatagc	1200
gcgtgacaaa	aaccacccaa	gcgtggtgat	gtggagtatt	gccaacgaac	cggatacccg	1260
tccgcaagtg	cacgggaata	tttcgccact	ggcgggaagca	acgcgtaaac	tcgacccgac	1320
gcgtccgatc	acctgcgtca	atgtaatgtt	ctgcgacgct	cacaccgata	ccatcagcga	1380
tctctttgat	gtgctgtgcc	tgaaccgtta	ttacggatgg	tatgtccaaa	gcggcgattt	1440
ggaaacggca	gagaaggtac	tggaaaaaga	acttctggcc	tggcaggaga	aactgcatca	1500
gccgattatc	atcaccgaat	acggcgtgga	tacgttagcc	gggctgcact	caatgtacac	1560
cgacatgtgg	agtgaagagt	atcagtgtgc	atggctggat	atgtatcacc	gcgtctttga	1620
tcgcgtcagc	gccgtcgtcg	gtgaacaggt	atggaatttc	gccgattttg	cgacctcgca	1680
aggcatattg	cgcgttggcg	gtaacaagaa	agggatcttc	actcgcgacc	gcaaaccgaa	1740
gtcggcggct	tttctgctgc	aaaaacgctg	gactggcatg	aacttcggtg	aaaaaccgca	1800
gcagggaggc	aaacaatgat	taattaacta	gagcggccgc	caccgcggcc	cgagattccg	1860
gcctcttcgg	ccgccaagcg	acccgggtgg	acgtctagag	gtacctagca	attaacagat	1920
agtttgccgg	tgataattct	cttaacctcc	cacactcctt	tgacataacg	atztatgtaa	1980
cgaaactgaa	atgtgaccag	atattgtgtc	cgcggtggag	ctccagcttt	tgttcccttt	2040
agtgaggggt	aatttcgagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	2100
gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	2160
gtgcctaata	agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	2220
cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcgcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	2280

tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	2340
tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatcgc	gttatccaca	gaatcagggg	2400
ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	2460
ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	2520
gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	2580
gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	2640
ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	2700
tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgacgaacc	ccccgttcag	ccgacccgct	2760
gcgccttata	cgttaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	ttatcgccac	2820
tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	2880
tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	atctgcgctc	2940
tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	3000
ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	3060
ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	3120
gttaagggat	tttggtcattg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaatt	3180
aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggctc	gacagttacc	3240
aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	tccatagttg	3300
cctgactccc	cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	3360
ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaaccagc	3420
cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	3480
ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	3540
ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggtatggct	tcattcagct	3600
ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	aaagcggtta	3660
gctccttcgg	tcctccgata	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	tcactcatgg	3720
ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	3780
ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	3840
gccccgcgtc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	3900
ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	agatccagtt	3960

cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	accagcgttt	4020
ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	gcgacacgga	4080
aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	caggggttatt	4140
gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	gggggttcgc	4200
gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	cgccctgtag	cggcgcatta	agcgcgggcg	4260
gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccctagcg	cccgttcctt	4320
tcgctttctt	cccttccttt	ctcgccacgt	tcgcccggctt	tccccgtcaa	gctctaaatc	4380
gggggctccc	tttaggggtt	cgatattagt	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	4440
attaggggtga	tggttcacgt	agtgggccat	cgccctgata	gacggttttt	cgccctttga	4500
cgttgagtc	cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	4560
ctatctcgg	ctattctttt	gatttataag	ggattttgcc	gatttcggcc	tattgggttaa	4620
aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattttta	caaaatatta	acgcttacaa	4680
tttccattcg	ccattcaggc	tgcgcaactg	ttgggaagg	cgatcgggtg	gggcctcttc	4740
gctattacgc	cagctggcga	aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	4800
agggttttcc	cagtcacgac	gttgtaaaac	gacggccagt	gaattgtaat	acgactcact	4860
atagggcgaa	ttgggtaccg	ggccccccct	cgaggtcgat	ggtgtcgata	agcttgatat	4920
cgaattcatg	tcacacaaac	cgatcttcgc	ctcaaggaaa	cctaattcta	catccgagag	4980
actgccgaga	tccagtctac	actgattaat	tttcgggcca	ataatttaaa	aaaatcgtgt	5040
tatataatat	tatatgtatt	atatatatac	atcatgatga	tactgacagt	catgtcccat	5100
tgtataaatag	acagactcca	tctgccgcct	ccaactgatg	ttctcaatat	ttaaggggtc	5160
atctcgcatt	gtttaataat	aaacagactc	catctaccgc	ctccaaatga	tgttctcaaa	5220
atatattgta	tgaacttatt	tttattactt	agtattatta	gacaacttac	ttgctttatg	5280
aaaaacactt	cctatttagg	aaacaattta	taatggcagt	tcgttcattt	aacaatttat	5340
gtagaataaaa	tggtataaat	gcgtatggga	aatcttaaat	atggatagca	taaatgatat	5400
ctgcattgcc	taattcgaaa	tcaacagcaa	cgaaaaaaat	cccttgta	acataaatag	5460
tcacgcagaa	atatcaacta	tcaaagaaca	gctattcaca	cgttactatt	gagattatta	5520
ttggacgaga	atcacacact	caactgtctt	tctctcttct	agaaatacag	gtacaagtat	5580
gtactattct	cattgttcat	acttctagtc	atttcatccc	acatattcct	tggatttctc	5640

tccaatgaat gacattctat cttgcaaatt caacaattat aataagatat accaaagtag	5700
cggatatagt gcaatcaaaa agcttctctg gtgtgcttct cgtatttatt tttattctaa	5760
tgatccatta aaggatatata tttatttctt gttatataat ccttttgttt attacatggg	5820
ctggatacat aaaggatattt tgatttaatt ttttgcttaa attcaatccc ccctcgttca	5880
gtgtcaactg taatggtagg aaattacat acttttgaag aagcaaaaaa aatgaaagaa	5940
aaaaaaaaatc gtatttccag gttagacgtt ccgcagaatc tagaatgcgg tatgcggtac	6000
attgttcttc gaacgtaaaa gttgcgctcc ctgagatatt gtacattttt gcttttacia	6060
gtacaagtac atcgtacaac tatgtactac tgttgatgca tccacaacag tttgttttgt	6120
ttttttttgt tttttttttt tctaattgatt cattaccgct atgtatacct acttgactt	6180
gtagtaagcc gggttattgg cgttcaatta atcatagact tatgaatctg cacgggtgtgc	6240
gctgcgagtt acttttagct tatgcatgct acttgggtgt aatattggga tctgttcgga	6300
aatcaacgga tgctcaaccg atttcgacag taataatttg aatcgaatcg gagcctaaaa	6360
tgaacccgag tatatctcat aaaattctcg gtgagaggtc tgtgactgtc agtacaaggt	6420
gccttcatta tgccctcaac cttaccatac ctactgaat gtagtgtacc tctaaaaatg	6480
aaatacagtg ccaaaagcca aggcaactgag ctctgtctaac ggacttgata tacaaccaat	6540
taaaacaaat gaaaagaaat acagttcttt gtatcatttg taacaattac cctgtacaaa	6600
ctaaggtatt gaaatcccac aatattccca aagtccaccc ctttccaaat tgtcatgcct	6660
acaactcata taccaagcac taacctacca aacaccacta aaaccccaca aaatatatct	6720
taccgaatat acagtaacaa gctaccacca cactcgttgg gtgcagtcgc cagcttaag	6780
atatctatcc acatcagcca caactccctt cctttaataa accgactaca cccttggtca	6840
ttgaggttat gagtgaatat actgtagaca agacactttc aagaagactg tttccaaaac	6900
gtaccactgt cctccactac aaacacaccc aatctgcttc ttctagtcaa ggttgctaca	6960
ccggtaaatt ataaatcatc atttcattag cagggcaggg ccctttttat agagtcttat	7020
aaactagcgg accctgccgg tagaccaacc cgcaggcgcg tcagtttgct ccttccatca	7080
atgcgtcgta gaaacgactt actccttctt gagcagctcc ttgaccttgt tggcaacaag	7140
tctccgacct cggaggtgga ggaagagcct ccgatatcgg cggtagtgat accagcctcg	7200
acggactcct tgacggcagc ctcaacagcg tcaccggcgg gcttcatggt aagagagaac	7260
ttgagcatca tggcggcaga cagaatggtg gcaatggggg tgaccttctg cttgccgaga	7320

tcgggggcag atccgtgaca gggctcgtac agaccgaacg cctcgttggg gtcgggcaga	7380
gaagccagag aggcggaggg cagcagaccc agagaaccgg ggatgacgga ggcctcgtcg	7440
gagatgatat cgccaaacat gttggtgggt atgatgatac cattcatctt ggagggctgc	7500
ttgatgagga tcatggcggc cgagtcgacg agctgggtgg tgaactcgag ctgggggaat	7560
tcgtccttga ggactcgagt gacagtcttt cgccaaagtc gagaggaggc cagcacgttg	7620
gccttgtaaa gagaccacac gggaagaggg ggggtgtgct gaagggccag gaaggcggcc	7680
attcgggcaa ttcgctcaac ctcaggaacg gagtaggtct cgggtgcgga agcgacgcca	7740
gatccgtcat cctcctttcg ctctccaaag tagatacctc cgacgagctc tcggacaatg	7800
atgaagtcgg tgccctcaac gtttcggatg ggggagagat cggcgagctt gggcgacagc	7860
agctggcagg gtcgcagggt ggcgtacagg ttcaggctct ttcgcagctt gaggagaccc	7920
tgctcgggtc gcacgtcggg tcgtccgtcg ggagtgggtc atacggtgtt ggcagcgcct	7980
ccgacagcac cgagcataat agagtcagcc ttcggcaga tgcgagagt agcgtcgggtg	8040
atgggctcgc cctccttctc aatggcagct cctccaatga gtcggtcctc aaacacaaac	8100
tcggtgccgg aggcctcagc aacagacttg agcaccttga cggcctcggc aatcacctcg	8160
gggccacaga agtcgcccgc gagaagaaca atcttcttgg agtcagctct ggtcttctta	8220
gtttcggggt ccattgtgga tgtgtgtggg tgtatgtgtg atgtggtgtg tggagtgaag	8280
atctgtgggt ggcaaacgct cttgtatata tacgcacttt tgcccgtgct atgtggaaga	8340
ctaaacctcc gaagattgtg actcaggtag tgcggtatcg gctagggacc caaaccttgt	8400
cgatgccgat agcgtatcgc aacgtacccc agccggccgg gactatgtcg gaggggacat	8460
acgagatcgt caagggtttg tggccaaactg gtaaataaat gatgtcgacg tttaaacagt	8520
gtacgcagat ctactataga ggaacattta aattgccccg gagaagacgg ccaggccggc	8580
tagatgacaa attcaacaac tcacagctga ctttctgcca ttgccactag gggggggcct	8640
ttttatatgg ccaagccaag ctctccacgt cgggtggggt gcacccaaca ataatgggt	8700
agggttgcac caacaaaggg atgggatggg gggtagaaga tacgaggata acggggctca	8760
atggcacaaa taagaacgaa tactgccatt aagactcgtg atccagcgac tgacaccatt	8820
gcatcatcta agggcctcaa aactacctcg gaactgctgc gctgatctgg acaccacaga	8880
ggttccgagc actttaggtt gcaccaaactg tcccaccagg tgcaggcaga aaacgctgga	8940
acagcgtgta cagtttgtct taacaaaaag tgagggcgct gaggtcgagc aggggtggtg	9000

gacttggttat agcctttaga gctgcgaaaag cgcgtatgga tttgggtcat caggccagat 9060
 tgaggggtctg tggacacatg tcatgttagt gtacttcaat cgccccctgg atatagcccc 9120
 gacaataggc cgtggcctca tttttttgcc ttccgcacat ttccattgct cgataccac 9180
 accttgcttc tcttgactt gccaacctta atactggttt acattgacca acatcttaca 9240
 agcggggggc ttgtctaggg tatatataaa cagtggctct cccaatcggg tgccagtctc 9300
 ttttttcctt tctttccca cagattcgaa atctaaacta cacatcacag aattccgagc 9360
 cgtgagtatc cacgacaaga tcagtgtcga gacgacgcgt tttgtgtaat gacacaatcc 9420
 gaaagtcgct agcaacacac actctctaca caaactaacc cagctctggg ac 9472

<210> 33
 <211> 7879
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pDMW237

<400> 33
 ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa 60
 gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtgcgagg atatagcaac 120
 ggatatttat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta 180
 aacatactgt acatactcat actcgtaccc gggcaacggg ttcaactgag tgcagtgggt 240
 agtgctctta ctcgtagagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgtat 300
 tcattcatgt tagttgcgta cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaatt 360
 gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 420
 tgtcgtgccg gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg 480
 ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag 540
 cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac gggtatccac agaatcaggg gataacgcag 600
 gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaaag gccgcgttgc 660
 tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 720
 agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 780
 tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 840
 cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 900
 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat 960

ccggttaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	1020
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt	1080
ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc	1140
cagttacctt cgaaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta	1200
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag	1260
atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca cgttaagggg	1320
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaataaaaaatgaa	1380
gttttaaatac aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa	1440
tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc	1500
ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga	1560
taccgcgaga ccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa	1620
gggccgagcg cagaagtggg cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt	1680
gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg	1740
ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc	1800
aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg	1860
gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttag ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag	1920
caactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt	1980
actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt	2040
caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac	2100
gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac	2160
ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag	2220
caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa	2280
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	2340
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	2400
cccgaaaagt gccacctgac gcgcctgtg gcggcgcat aagcgcgcg ggtgtggtgg	2460
ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgcctagc gcccgctcct ttcgctttct	2520
tcccttcctt tctcgccacg ttgcgcggct tccccgtca agctctaaat cgggggctcc	2580
ctttaggggt ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg	2640

atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt	2700
ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg	2760
tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc	2820
tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttccattc	2880
gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg cgggcctctt cgctattacg	2940
ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc	3000
ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga	3060
attgggtacc gggccccccc tcgaggtcga tgggtgcgat aagcttgata tcgaattcat	3120
gtcacacaaa ccgatcttcg cctcaaggaa acctaatctt acatccgaga gactgccgag	3180
atccagtcta cactgattaa ttttcgggcc aataatttaa aaaaatcgtg ttatataata	3240
ttatatgtat tatatatata catcatgatg atactgacag tcatgtccca ttgctaaata	3300
gacagactcc atctgccgcc tccaactgat gttctcaata ttttaaggggt catctcgcat	3360
tgtttaataa taaacagact ccatctaccg cctccaaatg atgttctcaa aatatattgt	3420
atgaacttat ttttattact tagtattatt agacaactta cttgctttat gaaaaaact	3480
tcctatttag gaaacaattt ataatggcag ttcgttcatt taacaattta tgtagaataa	3540
atgttataaa tgcgtatggg aaatcttaaa tatggatagc ataaatgata tctgcattgc	3600
ctaattcgaa atcaacagca acgaaaaaaaa tcccttgtag aacataaata gtcatcgaga	3660
aatatcaact atcaaagaac agctattcac acgttactat tgagattatt attggacgag	3720
aatcacacac tcaactgtct ttctctcttc tagaaataca ggtacaagta tgtactattc	3780
tcattgttca tacttctagt catttcatcc cacatattcc ttggatttct ctccaatgaa	3840
tgacattcta tcttgcaaata tcaacaatta taataagata taccaaagta gcggtatagt	3900
ggcaatcaaa aagcttctct ggtgtgcttc tcgtatttat ttttattcta atgatccatt	3960
aaaggatat atttatttct tgttatataa tccttttggt tattacatgg gctggataca	4020
taaaggattt ttgatttaat tttttgotta aattcaatcc cccctcgttc agtgtcaact	4080
gtaatggtag gaaattacca tacttttgaa gaagcaaaaa aaatgaaaga aaaaaaaaaat	4140
cgtatttcca ggtagacgt tccgcagaat ctagaatgcg gtatgcggta cattgttctt	4200
cgaacgtaaa agttgcgctc cctgagatat tgtacatttt tgcttttaca agtacaagta	4260
catcgtacaa ctatgtacta ctgttgatgc atccacaaca gtttgttttg ttttttttg	4320

tttttttttt ttctaattgat tcattaccgc tatgtataacc tacttgtact tgtagtaagc	4380
cggtttattg gcgttcaatt aatcatagac ttatgaatct gcacggtgtg cgctgcgagt	4440
tactttttagc ttatgcatgc tacttgggtg taatattggg atctgttcgg aaatcaacgg	4500
atgctcaatc gatttcgaca gtaattaatt aagtcataca caagtcagct ttcttcgagc	4560
ctcatataag tataagtagt tcaacgtatt agcactgtac ccagcatctc cgtatcgaga	4620
aacacaacaa catgccccat tggacagatc atgcggatac acaggttgtg cagtatcata	4680
catactcgat cagacaggtc gtctgaccat catacaagct gaacaagcgc tccataacttg	4740
cacgctctct atatacacag ttaaattaca tatccatagt ctaacctcta acagttaatc	4800
ttctggtaag cctcccagcc agccttctgg tatcgcttgg cctcctcaat aggatctcgg	4860
ttctggccgt acagacctcg gccgacaatt atgatatccg ttccggtaga catgacatcc	4920
tcaacagttc ggtactgctg tccgagagcg tctcccttgt cgtcaagacc caccgccggg	4980
gtcagaataa gccagtctc agagtcgccc ttaggtcggg tctgggcaat gaagccaacc	5040
acaaactcgg ggtcggatcg ggcaagctca atggtctgct tggagtactc gccagtggcc	5100
agagagccct tgcaagacag ctcggccagc atgagcagac ctctggccag cttctcgttg	5160
ggagagggga ctaggaactc cttgtactgg gagttctcgt agtcagagac gtcctccttc	5220
ttctgttcag agacagtttc ctcgccacca gctcgcaggc cagcaatgat tccggttccg	5280
ggtacaccgt gggcggttgg gatatcggac cactcggcga ttccggtgaca ccggtactgg	5340
tgcttgacag tgttgccaat atctgcgaac tttctgtcct cgaacaggaa gaaaccgtgc	5400
ttaagagcaa gttccttgag ggggagcaca gtgccggcgt aggtgaagtc gtcaatgatg	5460
tcgatatggg ttttgatcat gcacacataa ggtccgacct tatcggcaag ctcaatgagc	5520
tccttgggtg tggtaacatc cagagaagca cacaggttgg ttttcttggc tgccacgagc	5580
ttgagcactc gagcggcaaa ggcggacttg tggacgttag ctcgagcttc gtaggagggc	5640
attttgggtg tgaagaggag actgaaataa atttagtctg cagaactttt tatcggaacc	5700
ttatctgggg cagtgaagta tatgttatgg taatagttac gagttagttg aacttataga	5760
tagactggac tatacggcta tcggtccaaa ttagaaagaa cgtcaatggc tctctgggcg	5820
tcgcctttgc cgacaaaaat gtgatcatga tgaaagccag caatgacgtt gcagctgata	5880
ttgttgtcgg ccaaccgcgc cgaaaacgca gctgtcagac ccacagcctc caacgaagaa	5940
tgtatcgtca aagtgatcca agcacactca tagttggagt cgtactccaa aggcggcaat	6000

gacgagtcag acagatactc gtcgactcag gcgacgacgg aattcctgca gcccatctgc	6060
agaattcagg agagaccggg ttggcggcgt atttgtgtcc caaaaaacag cccaattgc	6120
cccgagagaag acggccaggc cgcctagatg acaaattcaa caactcacag ctgactttct	6180
gccattgcca ctaggggggg gcctttttat atggccaagc caagctctcc acgtcggttg	6240
ggctgcaccc aacaataaat gggtaggggt gcaccaacaa agggatggga tggggggtag	6300
aagatacgag gataacgggg ctcaatggca caaataagaa cgaatactgc cattaagact	6360
cgtgatccag cgactgacac cattgcatca tctaagggcc tcaaaactac ctcggaactg	6420
ctgcgctgat ctggacacca cagaggttcc gagcacttta ggttgcacca aatgtcccac	6480
caggtgcagg cagaaaacgc tggaacagcg tgtacagttt gtcttaacaa aaagtgaggg	6540
cgctgaggtc gagcaggggt gtgtgacttg ttatagcctt tagagctgcg aaagcgcgta	6600
tggatttggc tcatcaggcc agattgaggg tctgtggaca catgtcatgt tagtgtactt	6660
caatcgcccc ctggatatag ccccgacaat aggccgtggc ctcatTTTTT tgccttccgc	6720
acatttccat tgctcggtac ccacacctg cttctcctgc acttgccaac cttaatactg	6780
gtttacattg accaacatct tacaagcggg gggcttgtct agggatatata taaacagtgg	6840
ctctcccaat cggttgccag tctotTTTTT ctttctttc cccacagatt cgaaatctaa	6900
actacacatc acacaatgcc tgttactgac gtccttaagc gaaagtccgg tgtcatcgtc	6960
ggcgacgatg tccgagccgt gagtatccac gacaagatca gtgtcgagac gacgcgtttt	7020
gtgtaatgac acaatccgaa agtcgctagc aacacacact ctctacacaa actaaccag	7080
ctctccatgg ctctggccaa cgacgctggc gagcgaatct gggctgccgt caccgatccc	7140
gaaatcctca ttggcacctt ctcttacctg ctctgaagc ctctcctgcg aaactctggt	7200
ctcgtggacg agaagaaagg agcctaccga acctccatga tctggtacaa cgtcctcctg	7260
gctctcttct ctgccctgtc cttctacgtg actgccaccg ctctcggtg ggactacggt	7320
actggagcct ggctgcgaag acagaccggt gatactcccc agcctctctt tcagtgtccc	7380
tctcctgtct gggactccaa gctgttcacc tggactgcca aggccttcta ctattctaag	7440
tacgtggagt acctcgacac cgcttggtg gtcctcaagg gcaagcgagt gtcctttctg	7500
caggccttcc atcactttgg agctccctgg gacgtctacc tcggcattcg actgcacaac	7560
gaggggtgtg ggatcttcat gttctttaac tcgttcattc acaccatcat gtacacctac	7620
tatggactga ctgccgctgg ctacaagttc aaggccaagc ctctgatcac tgccatgcag	7680

```

atttgccagt tgcgctgggtg ctttctcctg gtctgggact acatcaacgt tccctgcttc 7740
aactctgaca agggcaagct gttctcctgg gctttcaact acgcctacgt cggatctgtc 7800
tttctcctgt tctgtcactt cttttaccag gacaacctgg ccaccaagaa atccgctaag 7860
gctggtaagc agcttttagc 7879

```

```

<210> 34
<211> 7783
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo pY115

```

```

<400> 34
catggctctg gccaacgacg ctggcgagcg aatctgggct gccgtcaccg atcccgaat 60
cctcattggc accttctcct acctgctcct gaagcctctc ctgcgaaact ctgggtctcgt 120
ggacgagaag aaaggagcct accgaacctc catgatctgg tacaacgtcc tcttggtctt 180
cttctctgcc ctgtccttct acgtgactgc caccgctctc ggctgggact acgggtactgg 240
agcctggctg cgaagacaga ccggtgatac tccccagcct ctctttcagt gtccctctcc 300
tgtctgggac tccaagctgt tcacctggac tgccaaggcc ttctactatt ctaagtacgt 360
ggagtacctc gacaccgctt ggctgggtcct caagggcaag cgagtgtcct ttctgcaggc 420
cttccatcac tttggagctc cctgggacgt ctacctcggc attcgactgc acaacgaggg 480
tgtgtggatc ttcatgttct ttaactcggt cattcacacc atcatgtaca cctactatgg 540
actgactgcc gctggctaca agttcaaggc caagcctctg atcactgcca tgcagatttg 600
ccagttcgtc ggtggctttc tcttggtctg ggactacatc aacgttccct gcttcaactc 660
tgacaagggc aagctgttct cctgggcttt caactacgcc tacgtcggat ctgtctttct 720
cctgttctgt cacttctttt accaggacaa cctggccacc aagaaatccg ctaaggctgg 780
taagcagctt tagcggccgc aagtgtggat ggggaagtga gtgcccggtt ctgtgtgcac 840
aattggcaat ccaagatgga tggattcaac acagggatat agcgagctac gtgggtgggtgc 900
gaggatatag caacggatat ttatgtttga cacttgagaa tgtacgatac aagcactgtc 960
caagtacaat actaaacata ctgtacatac tcatactcgt acccgggcaa cggtttcaact 1020
tgagtgcagt ggctagtgtc cttactcgta cagtgtgcaa tactgcgtat catagtcttt 1080
gatgtatatc gtattcattc atgttagttg cgtacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 1140
ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgctg ttgcgctcac tgcccgcctt 1200

```

ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg	1260
cggtttgctg attgggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc gctcggctgt	1320
tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc	1380
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa	1440
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa	1500
tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc	1560
ccctggaagc tccctcgctg gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc	1620
cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag	1680
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccg	1740
ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttctc	1800
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac	1860
agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg	1920
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaca	1980
aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa	2040
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa	2100
ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt	2160
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt ggtctgacag	2220
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgac tgtctatttc gttcatccat	2280
agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc	2340
cagtgctgca atgataccgc gagaccacg ctaccgggt ccagatttat cagcaataaa	2400
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctcctgca actttatccg cctccatcca	2460
gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa	2520
cgttggtgcc attgctacag gcatcgttgt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt	2580
cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc	2640
ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tggtatcact	2700
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc	2760
tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg	2820
ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgtc	2880

catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc	2940
cagttcgatg taaccactc gtgcaccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag	3000
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac	3060
acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg	3120
ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt	3180
tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc	3240
ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcggcc tagcggccgc	3300
tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct	3360
aaatcggggg ctccctttag ggttcgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaaa	3420
acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc	3480
tttgacgttg gagtccacgt tctttaatat tggactcttg ttccaaactg gaacaacact	3540
caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggtt ttgccgattt cggcctattg	3600
gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaaa tattaacgct	3660
tacaatttcc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc	3720
tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta	3780
acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt gtaatacgac	3840
tcactatagg gcgaattggg taccggggccc cccctcgagg tcgatggtgt cgataagctt	3900
gatatcgaat tcatgtcaca caaaccgatc ttcgcctcaa ggaaacctaa ttctacatcc	3960
gagagactgc cgagatccag tctacactga ttaattttcg ggccaataat ttaaaaaaat	4020
cgtgttatat aatattatat gtattatata tatacatcat gatgatactg acagtcattg	4080
cccattgcta aatagacaga ctccatctgc cgcctccaac tgatgttctc aatatttaag	4140
gggtcatctc gcattgttta ataataaaca gactccatct accgcctcca aatgatgttc	4200
tcaaaatata ttgtatgaac ttatttttat tacttagtat tattagacaa ctacttgct	4260
ttatgaaaaa cacttctat ttaggaaaca atttataatg gcagttcggt catttaacaa	4320
tttatgtaga ataaatgtta taaatgcgta tgggaaatct taaatatgga tagcataaat	4380
gatatctgca ttgcctaatt cgaaatcaac agcaacgaaa aaaatccctt gtacaacata	4440
aatagtcatc gagaaatc aactatcaaa gaacagctat tcacacgtta ctattgagat	4500
tattattgga cgagaatcac aactcaact gtctttctct cttctagaaa tacagggtaca	4560

agtatgtact attctcattg ttcatacttc tagtcatttc atcccacata ttccttggtat	4620
ttctctccaa tgaatgacat tctatcttgc aaattcaaca attataataa gatataccaa	4680
agtagcggta tagtggcaat caaaaagctt ctctgggtgtg cttctcgtat ttatTTTTat	4740
tctaatagatc cattaaaggt atatatttat ttcttggtat ataatccttt tgtttattac	4800
atgggctgga tacataaagg tattttgatt taattttttg cttaaattca atccccctc	4860
gttcagtgtc aactgtaatg gtaggaaatt accatacttt tgaagaagca aaaaaaatga	4920
aagaaaaaaaa aaatcgtatt tccagggttag acgttccgca gaatctagaa tgcggtatgc	4980
ggtacattgt tcttcgaacg taaaagttgc gctccctgag atattgtaca tttttgcttt	5040
tacaagtaca agtacatcgt acaactatgt actactgttg atgcatccac aacagtttgt	5100
tttgTTTTtt tttgTTTTtt ttttttctaa tgattcatta ccgctatgta tacctacttg	5160
tactttagt aagccggggtt attggcggtc aattaatcat agacttatga atctgcacgg	5220
tgtgcgctgc gagttacttt tagcttatgc atgctacttg ggtgtaatat tgggatctgt	5280
tcggaaatca acggatgctc aatcgatttc gacagtaatt aattaagtca tacacaagtc	5340
agctttcttc gagcctcata taagtataag tagttcaacg tattagcact gtaccagca	5400
tctccgtatc gagaaacaca acaacatgcc ccattggaca gatcatgcgg atacacaggt	5460
tgtgcagtat catacatact cgatcagaca ggtcgtctga ccatcataca agctgaacaa	5520
gcgctccata cttgcacgct ctctatatac acagttaaatt tacatatcca tagtctaacc	5580
tctaacagtt aatcttctgg taagcctccc agccagcctt ctggtatcgc ttggcctcct	5640
caataggatc tcggttctgg ccgtacagac ctcgccgac aattatgata tccgttccgg	5700
tagacatgac atcctcaaca gttcgggtact gctgtccgag agcgtctccc ttgtcgtcaa	5760
gacccacccc gggggtcaga ataagccagt cctcagagtc gcccttaggt cggttctggg	5820
caatgaagcc aaccacaaac tcggggtcgg atcgggcaag ctcaatggtc tgcttgaggt	5880
actcgccagt ggccagagag cccttgcaag acagctcggc cagcatgagc agacctctgg	5940
ccagcttctc gttgggagag gggactagga actccttgta ctgggagttc tcgtagtcat	6000
agacgtctc cttcttctgt tcagagacag tttcctcggc accagctcgc aggccagcaa	6060
tgattccggt tccgggtaca ccgtggcggt tggatgatc ggaccactcg gcgattcgggt	6120
gacaccggta ctggtgcttg acagtgttg caatatctgc gaactttctg tctcgaaca	6180
ggaagaaacc gtgcttaaga gcaagttcct tgaggggggag cacagtgccg gcgtaggtga	6240


```

agtcgtcaat gatgtcgata tgggttttga tcatgcacac ataaggtccg accttatcgg 6300
caagctcaat gagctccttg gtggtggtaa catccagaga agcacacagg ttggttttct 6360
tgggtgccac gagcttgagc actcgagcgg caaaggcgga cttgtggacg ttagctcgag 6420
cttcgtagga gggcattttg gtggtgaaga ggagactgaa ataaatttag tctgcagaac 6480
tttttatcgg aaccttatct ggggcagtga agtatatgtt atggtaatag ttacgagtta 6540
gttgaactta tagatagact ggactatacg gctatcggtc caaattagaa agaacgtcaa 6600
tgggtctctg ggcgtgcct ttgccgacaa aaatgtgatc atgatgaaag ccagcaatga 6660
cgttgacgct gatattgttg tcggccaacc gcgccgaaaa cgcagctgtc agaccacag 6720
cctccaacga agaattgtatc gtcaaagtga tccaagcaca ctcatagttg gagtcgtact 6780
ccaaaggcgg caatgacgag tcagacagat actcgtcgac gtttaaacag tgtacgcaga 6840
tctactatag aggaacattt aaattgcccc ggagaagacg gccaggccgc ctagatgaca 6900
aattcaacaa ctcacagctg actttctgcc attgccacta gggggggggc tttttatatg 6960
gccaaagcaa gctctccacg tcggttgggc tgcaccaaac aataaatggg taggggtgca 7020
ccaacaaagg gatgggatgg ggggtagaag atacgaggat aacggggctc aatggcacia 7080
ataagaacga atactgccat taagactcgt gatccagcga ctgacaccat tgcacatct 7140
aagggcctca aaactacctc ggaactgctg cgctgatctg gacaccacag aggttccgag 7200
cacttttagt tgcaccaa atgtcccaccag gtgcaggcag aaaacgctgg aacagcgtgt 7260
acagtttgtc ttaacaaaaa gtgagggcgc tgaggtcgag cagggtggtg tgacttggtta 7320
tagcctttag agctgcgaaa gcgcgtatgg atttggctca tcaggccaga ttgagggctt 7380
gtggacacat gtcatgttag tgtacttcaa tcgccccctg gatatagccc cgacaatagg 7440
ccgtggcctc atttttttgc cttccgcaca tttccattgc tcgataccca caccttgctt 7500
ctcctgcact tgccaacctt aatactgggt tacattgacc aacatcttac aagcgggggg 7560
cttgtctagg gtatatataa acagtggctc tcccaatcgg ttgccagtct cttttttcct 7620
ttctttcccc acagattcga aatctaaact acacatcaca gaattccgag ccgtgagtat 7680
ccacgacaag atcagtgtcg agacgacgcg ttttgtgtaa tgacacaatc cgaaagtgcg 7740
tagcaacaca cactctctac acaaactaac ccagctctgg tac 7783

```

<210> 35

<211> 8254

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo pY175

<400> 35

```

ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa      60
gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtgcgagg atatagcaac      120
ggatatattat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta      180
aacatactgt acatactcat actcgtaccc ggcaacggtt tcacttgagt gcagtggcta      240
gtgctcttac tcgtacagtg tgcaatactg cgtatcatag tctttgatgt atatcgtatt      300
cattcatggt agttgcgtac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatt      360
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct      420
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg      480
gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc      540
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg      600
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct      660
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca      720
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct      780
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc      840
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcaattcgg tgtaggctcg      900
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttacc      960
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc     1020
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg     1080
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgtgaagc     1140
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag     1200
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga     1260
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat     1320
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaatt aaaaatgaag     1380
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat     1440
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc     1500
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat     1560

```

accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	1620
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg	1680
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	1740
tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca	1800
acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg	1860
tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc	1920
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	1980
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc	2040
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	2100
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	2160
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc tttactttc accagcgttt ctgggtgagc	2220
aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat	2280
actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	2340
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	2400
ccgaaaagtg ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggtggt	2460
tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt	2520
cccttccttt ctgcccacgt tcgcgggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc	2580
tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga	2640
tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc	2700
cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggt	2760
ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct	2820
gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgcttaca tttccattcg	2880
ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc	2940
cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc	3000
cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa	3060
ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgat ggtgtcgata agcttgatat cgaattcatg	3120
tcacacaaac cgatcttcgc ctcaaggaaa cctaattcta catccgagag actgccgaga	3180
tcagttctac actgattaat tttcggggcca ataatttaaa aaaatcgtgt tatataatat	3240

tatatgtatt atatatatac atcatgatga tactgacagt catgtcccat tgctaaatag	3300
acagactcca tctgccgcct ccaactgatg ttctcaatat ttaaggggtc atctcgcat	3360
gtttaataat aaacagactc catctaccgc ctccaaatga tgttctcaaa atatattgta	3420
tgaacttatt tttattactt agtattatta gacaacttac ttgctttatg aaaaacactt	3480
cctatttagg aaacaattta taatggcagt tcgttcattt aacaatttat gtagaataaa	3540
tgttataaat gcgtatggga aatcttaaat atggatagca taaatgatat ctgcattgcc	3600
taattcgaaa tcaacagcaa cgaaaaaaat cccttgtaaca acataaatag tcatcgagaa	3660
atatcaacta tcaaagaaca gctattcaca cgttactatt gagattatta ttggacgaga	3720
atcacacact caactgtctt tctctcttct agaaatacag gtacaagtat gtactattct	3780
cattgttcat acttctagtc atttcatccc acatattcct tggatttctc tccaatgaat	3840
gacattctat ctgcaaaatt caacaattat aataagatat accaaagtag cggtatagtg	3900
gcaatcaaaa agcttctctg gtgtgcttct cgtatttatt tttattctaa tgatccatta	3960
aaggatatata tttatttctt gttatataat ccttttgttt attacatggg ctggatacat	4020
aaaggatatt tgatttaatt ttttgcttaa attcaatccc ccctcgttca gtgtcaactg	4080
taatggtagg aaattacat acttttgaag aagcaaaaaa aatgaaagaa aaaaaaatc	4140
gtatttccag gtagacgtt ccgcagaatc tagaatgcg tatgcggtac attgttcttc	4200
gaacgtaaaa gttgcgctcc ctgagatatt gtacattttt gcttttaca gtacaagtac	4260
atcgtacaac tatgtactac tgttgatgca tccacaacag tttgtttgt tttttttgt	4320
ttttttttt tctaattgatt cattaccgct atgtatacct acttgtaact gtagtaagcc	4380
gggttattgg cgttcaatta atcatagact tatgaatctg cacggtgtgc gctgcgagtt	4440
acttttagct tatgcatgct acttgggtgt aatattggga tctgttcgga aatcaacgga	4500
tgtcaatcg atttcgacag taattaatta agtcatacac aagtcagctt tcttcgagcc	4560
tcatataagt ataagtagtt caacgtatta gcactgtacc cagcatctcc gtatcgagaa	4620
acacaacaac atgccccatt ggacagatca tgcggataca cagggtgtgc agtatcatac	4680
atactcgatc agacaggtcg tctgaccatc atacaagctg aacaagcgct ccatacttgc	4740
acgctctcta tatacacagt taaattacat atccatagtc taacctctaa cagttaatct	4800
tctggtaagc ctcccagcca gccttctgg atcgcttggc ctctcaata ggatctcggt	4860
tctggccgta cagacctcg cgcacaatta tgatatccgt tccggtagac atgacatcct	4920

caacagttcg	gtactgctgt	ccgagagcgt	ctcccttgtc	gtcaagaccc	accccggggg	4980
tcagaataag	ccagtcctca	gagtcgccct	taggtcgggt	ctgggcaatg	aagccaacca	5040
caaactcggg	gtcggatcgg	gcaagctcaa	tggtctgctt	ggagtactcg	ccagtggcca	5100
gagagccctt	gcaagacagc	tcggccagca	tgagcagacc	tctggccagc	ttctcgttgg	5160
gagaggggac	taggaactcc	ttgtactggg	agttctcgta	gtcagagacg	tcctccttct	5220
tctgttcaga	gacagtttcc	tcggcaccag	ctcgcaggcc	agcaatgatt	ccggttcggg	5280
gtacaccgtg	ggcgttggtg	atatcggacc	actcggcgat	tcggtgacac	cggtagtggt	5340
gcttgacagt	gttgccaata	tctgcgaact	ttctgtcctc	gaacaggaag	aaaccgtgct	5400
taagagcaag	ttccttgagg	gggagcacag	tgccggcgta	ggtgaagtcg	tcaatgatgt	5460
cgatatgggt	tttgatcatg	cacacataag	gtccgacctt	atcggcaagc	tcaatgagct	5520
ccttggtggt	ggtaacatcc	agagaagcac	acaggttggt	tttcttggtt	gccacgagct	5580
tgagcactcg	agcggcaaag	gcggaacttg	ggacgttagc	tcgagcttcg	taggagggca	5640
ttttggtggt	gaagaggaga	ctgaaataaa	tttagtctgc	agaacttttt	atcggaaacct	5700
tatctggggc	agtgaagtat	atgttatggt	aatagttacg	agttagttga	acttatagat	5760
agactggact	atacggctat	cggtcctaat	tagaaagaac	gtcaatggct	ctctgggcgt	5820
cgcctttgcc	gacaaaaatg	tgatcatgat	gaaagccagc	aatgacgttg	cagctgatat	5880
tgttgctcgg	caaccgcgcc	gaaaacgcag	ctgtcagacc	cacagcctcc	aacgaagaat	5940
gtatcgtcaa	agtgatccaa	gcacactcat	agttggagtc	gtactccaaa	ggcggcaatg	6000
acgagtcaga	cagatactcg	tcgacgttta	aacagtgtac	gcagatctac	tatagaggaa	6060
catttaaat	gccccggaga	agacggccag	gccgcctaga	tgacaaattc	aacaactcac	6120
agctgacttt	ctgccattgc	cactaggggg	gggccttttt	atatggccaa	gccaagctct	6180
ccacgtcggg	tgggctgcac	ccaacaataa	atgggtaggg	ttgcaccaac	aaagggatgg	6240
gatggggggg	agaagatacg	aggataacgg	ggctcaatgg	cacaaataag	aacgaatact	6300
gccattaaga	ctcgtgatcc	agcgactgac	accattgcat	catctaaggg	cctcaaaact	6360
acctcggaac	tgctgcgctg	atctggacac	cacagagggt	ccgagcactt	taggttgcac	6420
caaatgtccc	accaggtgca	ggcagaaaac	gctggaacag	cgtgtacagt	ttgtcttaac	6480
aaaaagtgag	ggcgtgagg	tcgagcaggg	tggtgtgact	tgttatagcc	tttagagctg	6540
cgaagcgcg	tatggatttg	gctcatcagg	ccagattgag	ggtctgtgga	cacatgtcat	6600

gtagtgtag	ttcaatcgcc	cctggatat	agccccgaca	ataggccgtg	gcctcatttt	6660
tttgccttcc	gcacatttcc	attgctcgat	accacacct	tgcttctcct	gcacttgcca	6720
accttaatac	tggtttacat	tgaccaacat	cttacaagcg	gggggcttgt	ctaggggtata	6780
tataaacagt	ggctctccca	atcggttgcc	agtctctttt	ttcctttctt	tccccacaga	6840
ttcgaaatct	aaactacaca	tcacagaatt	ccgagccgtg	agtatccacg	acaagatcag	6900
tgctgagacg	acgcgttttg	tgtaatgaca	caatccgaaa	gtcgctagca	acacacactc	6960
tctacacaaa	ctaaccagc	tctggtacca	tggtgaaaag	gccagcactt	ccgctgaccg	7020
ttgatggtgt	cacctatgat	gtgtctgcct	ggttgaaacca	tcatccaggg	ggtgctgaca	7080
tcattgagaa	ctaccgcggt	cgtgatgcca	ctgatgtctt	tatggttatg	cactctgaaa	7140
atgctgtgag	taaactaaga	aggatgccta	tcatggaacc	atcatctcca	ctgacgccta	7200
cgccaccgaa	acccaactca	gacgaaccgc	aggaggattt	ccgcaagctc	cgagatgagc	7260
tcatcgcagc	aggaatgttc	gacgcatcac	cgatgtggta	cgcataataag	acgctcacta	7320
cgctgggcct	cggggtcctc	gcggtgctat	tgatgacca	gtggcactgg	tacctcgctg	7380
gggcaatcgt	gttgggcatt	cacttccaac	aatgggttg	gttgctgcac	gatatctgcc	7440
accatcagct	gttcaaggac	cgatcgatca	acaacgccat	cggcttgctt	ttcgggaacg	7500
tcttgcaagg	gttctctgtg	acctggtgga	aggacaggca	caatgcacac	cactccgcca	7560
ccaacgtgca	aggccacgac	cccgacattg	acaacctgcc	gctgctggca	tggtccaagg	7620
aggacgtgga	gagggccggc	ccgttctcac	ggcggatgat	caagtaccag	caatactact	7680
tcttcttcat	ctgtgccctc	ctgaggttca	tctggtgctt	ccagagcatc	cacacagcca	7740
agggcctgaa	ggatcgacgc	aaccagtact	accgcaggca	gtacgagaaa	gagagcgtgg	7800
gcctggccct	ccactggggc	ctgaaggcgt	tggtctacta	cttttatatg	ccaagcttct	7860
tgaccggact	catggtgttt	ttcgtgtccg	agttgcttgg	gggcttcggc	atcgccatcg	7920
tggtgttcat	gaaccactac	cccctggaga	agatccagga	ctcggtgtgg	gacggccacg	7980
gcttttgctc	cggccagatt	cacgaaacga	tgaacgtcca	gcggggactc	gtcacggact	8040
ggttcttcgg	tggtctgaat	taccaaatac	agcaccacct	gtggccgacg	ctgccccggc	8100
acaacctgac	ggcggccagc	atcaaagtgg	agcagttgtg	caagaagcac	aacttgccgt	8160
atcgagccc	ccaatgctg	gagggggtgg	gcacctgat	cagctacctg	ggcacctttg	8220
cccgcattgt	ggcaaaggcc	gacaaggcgt	aagc			8254

<210> 36
 <211> 8254
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pY176

<400> 36
 ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa 60
 gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tggtagcgagg atatagcaac 120
 ggatatattat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta 180
 aacatactgt acatactcat actcgtaccc ggcaacggtt tcacttgagt gcagtggcta 240
 gtgctcttac tcgtacagtg tgcaatactg cgtatcatag tctttgatgt atatcgtatt 300
 cattcatgtt agttgcgtac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 360
 agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct 420
 gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 480
 gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 540
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 600
 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 660
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 720
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 780
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgcgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 840
 gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggctgt 900
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatac 960
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 1020
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 1080
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 1140
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 1200
 cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 1260
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 1320
 tttggatcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag 1380
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat 1440

cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	1500
cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	1560
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	1620
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	1680
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	1740
tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca	1800
acgatcaagg cgagttacat gatcccccac gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg	1860
tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcaactcatgg ttatggcagc	1920
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	1980
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc	2040
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	2100
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	2160
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcggtt ctgggtgagc	2220
aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat	2280
actcatactc ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	2340
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	2400
ccgaaaagtg ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatca agcgcggcgg gtgtgggtgg	2460
tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt	2520
cccttccttt ctcgccacgt tcgcccggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc	2580
tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga	2640
tgggtcacgt agtgggcat cgccctgata gacgggtttt cgccctttga cgttggagtc	2700
cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcgg	2760
ctattctttt gatattataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct	2820
gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgcttaca tttccattcg	2880
ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc	2940
cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc aggggtttcc	3000
cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa	3060
ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgat ggtgtcgata agcttgatat cgaattcatg	3120

tcacacaaac cgatcttgcg ctcaaggaaa cctaattcta catccgagag actgccgaga	3180
tccagtctac actgattaat ttctgggcca ataatttaaa aaaatcgtgt tatataatat	3240
tatatgtatt atatatatac atcatgatga tactgacagt catgtcccat tgctaaatag	3300
acagactcca tctgccgcct ccaactgatg ttctcaatat ttaaggggtc atctcgcatt	3360
gtttaataat aaacagactc catctaccgc ctccaaatga tgttctcaaa atatattgta	3420
tgaacttatt tttattactt agtattatta gacaacttac ttgctttatg aaaaacactt	3480
cctatttagg aaacaattta taatggcagt tcgttcattt aacaatttat gtagaataaa	3540
tgttataaat gcgtatggga aatcttaaat atggatagca taaatgatat ctgcattgcc	3600
taattcgaaa tcaacagcaa cgaaaaaat cccttgtaac acataaatag tcatcgagaa	3660
atatcaacta tcaaagaaca gctattcaca cgttactatt gagattatta ttggacgaga	3720
atcacacact caactgtctt tctctcttct agaaatacag gtacaagtat gtactattct	3780
cattgttcat acttctagtc atttcatccc acatattcct tggatttctc tccaatgaat	3840
gacattctat ctgcaaatt caacaattat aataagatat accaaagtag cggtatagtg	3900
gcaatcaaaa agcttctctg gtgtgcttct cgtatttatt tttattctaa tgatccatta	3960
aaggatatata tttatttctt gttatataat ccttttgttt attacatggg ctggatacat	4020
aaaggatatt tgatttaatt ttttgcttaa attcaatccc ccctcgttca gtgtcaactg	4080
taatggtagg aaattaccat acttttgaag aagcaaaaaa aatgaaagaa aaaaaaatc	4140
gtatttccag gttagacgtt ccgcagaatc tagaatgcgg tatgcggtac attgttcttc	4200
gaacgtaaaa gttgcgctcc ctgagatatt gtacattttt gcttttaca gtacaagtac	4260
atcgtacaac tatgtactac tgttgatgca tccacaacag tttgttttgt ttttttttgt	4320
tttttttttt tctaattgatt cattaccgct atgtatacct acttgtaact gtagtaagcc	4380
gggttattgg cgttcaatta atcatagact tatgaatctg cacggtgtgc gctgcgagtt	4440
acttttagct tatgcatgct acttgggtgt aatattggga tctgttcgga aatcaacgga	4500
tgctcaatcg atttcgacag taattaatta agtcatacac aagtcagctt tcttcgagcc	4560
tcatataagt ataagtagtt caacgtatta gcaactgtacc cagcatctcc gtatcgagaa	4620
acacaacaac atgccccatt ggacagatca tgccgatata caggttgtgc agtatcatac	4680
atactcgatc agacaggctg tctgaccatc atacaagctg aacaagcgtc ccatacttgc	4740
acgtctctta tatacacagt taaattacat atccatagtc taacctctaa cagttaattct	4800

tctggttaagc	ctcccagcca	gcctttctggt	atcgcttggc	ctcctcaata	ggatctcggg	4860
tctggccgta	cagacctcgg	ccgacaatta	tgatatccgt	tccggtagac	atgacatcct	4920
caacagttcg	gtactgctgt	ccgagagcgt	ctcccttgtc	gtcaagaccc	acccccgggg	4980
tcagaataag	ccagtcctca	gagtcgccct	taggtcgggt	ctgggcaatg	aagccaacca	5040
caaactcggg	gtcggatcgg	gcaagctcaa	tggctctgctt	ggagtactcg	ccagtggcca	5100
gagagccctt	gcaagacagc	tcggccagca	tgagcagacc	tctggccagc	ttctcgttgg	5160
gagaggggac	taggaactcc	ttgtactggg	agttctcgta	gtcagagacg	tcctccttct	5220
tctgttcaga	gacagtttcc	tcggcaccag	ctcgcaggcc	agcaatgatt	ccggttcogg	5280
gtacaccgtg	ggcgttgggt	atatcggacc	actcggcgat	tcggtgacac	cggtagtggg	5340
gcttgacagt	gttgccaata	tctgcgaact	ttctgtcctc	gaacaggaag	aaaccgtgct	5400
taagagcaag	ttccttgagg	gggagcacag	tgccggcgta	ggtgaagtcg	tcaatgatgt	5460
cgatatgggt	tttgatcatg	cacacataag	gtccgacctt	atcggcaagc	tcaatgagct	5520
ccttggtggt	ggtaacatcc	agagaagcac	acaggttggt	tttcttggtt	gccacgagct	5580
tgagcactcg	agcggcaaa	gcggaactgt	ggacgttagc	tcgagcttcg	taggagggca	5640
ttttggtggt	gaagaggaga	ctgaaataaa	tttagtctgc	agaacttttt	atcggaacct	5700
tatctggggc	agtgaagtat	atgttatggt	aatagttacg	agttagtga	acttatagat	5760
agactggact	atacggctat	cgttccaaat	tagaaagaac	gtcaatggct	ctctgggcgt	5820
cgcctttgcc	gacaaaaatg	tgatcatgat	gaaagccagc	aatgacgttg	cagctgatat	5880
tgttgctcggc	caaccgcgcc	gaaaacgcag	ctgtcagacc	cacagcctcc	aacgaagaat	5940
gtatcgtcaa	agtgatccaa	gcacactcat	agttggagtc	gtactccaaa	ggcggcaatg	6000
acgagtcaga	cagatactcg	tcgacgttta	aacagtgtac	gcagatctac	tatagaggaa	6060
catttaaatt	gccccggaga	agacggccag	gccgcctaga	tgacaaattc	aacaactcac	6120
agctgacttt	ctgccattgc	cactaggggg	gggccttttt	atatggccaa	gccaagctct	6180
ccacgtcggg	tgggctgcac	ccaacaataa	atgggtaggg	ttgcaccaac	aaagggatgg	6240
gatggggggg	agaagatacg	aggataacgg	ggctcaatgg	cacaaataag	aacgaatact	6300
gccattaaga	ctcgtgatcc	agcgactgac	accattgcat	catctaaggg	cctcaaaact	6360
acctcggaac	tgctgcgctg	atctggacac	cacagagggt	ccgagcactt	taggttgcac	6420
caaatgtccc	accaggtgca	ggcagaaaac	gctggaacag	cgtgtacagt	ttgtcttaac	6480

aaaaagtgag	ggcgctgagg	tcgagcaggg	tgggtgtgact	tgttatagcc	tttagagctg	6540
cgaaagcgcg	tatggatttg	gctcatcagg	ccagattgag	ggctctgtga	cacatgtcat	6600
gttagtgtac	ttcaatcgcc	ccttgatat	agccccgaca	ataggccgtg	gcctcatttt	6660
tttgcccttc	gcacatttcc	attgctcgat	acccacacct	tgcttctcct	gcacttgcca	6720
accttaatac	tggtttacat	tgaccaacat	cttacaagcg	gggggcttgt	ctaggggtata	6780
tataaacagt	ggctctccca	atcggttgcc	agtctctttt	ttcctttctt	tccccacaga	6840
ttcgaaatct	aaactacaca	tcacagaatt	ccgagccgtg	agtatccacg	acaagatcag	6900
tgctcgagacg	acgcgttttg	tgtaatgaca	caatccgaaa	gtcgctagca	acacacactc	6960
tctacacaaa	ctaaccacgc	tctggtacca	tggtgaaaag	gccagcactt	ccgctgaccg	7020
ttgatgggtg	cacctatgat	gtgtctgcct	ggttgaacca	tcatccaggg	gggtctgaca	7080
tcattgagaa	ctaccgcggt	cgtgatgcca	ctgatgtctt	tatggttatg	cactctgaaa	7140
atgctgtgag	taaactaaga	aggatgccta	tcatggaacc	atcatctcca	ctgacgccta	7200
cgccaccgaa	acccaactca	gacgaaccgc	aggaggattt	ccgcaagctc	cgagatgagc	7260
tcatcgcagc	aggaatgttc	gacgcatcac	cgatgtggta	cgcatataag	acgctcagta	7320
cgctgggcct	cggggtcctc	gcggtgctat	tgatgacca	gtggcactgg	tacctcgteg	7380
gggcaatcgt	gttgggcatt	cacttccaac	aatggggttg	gttgtcgac	gatatctgcc	7440
accatcagct	gttcaaggac	cgatcgatca	acaacgccat	cggcttgctt	ttcgggaacg	7500
tcttgcaagg	gttctctgtg	acctggtgga	aggacaggca	caatgcacac	cactccgcca	7560
ccaacgtgca	aggccacgac	cccgacattg	acaacctgcc	gctgctggca	tggtccaagg	7620
aggacgtgga	gagggccggc	ccgttctcac	ggcggattat	caagtaccag	caatactact	7680
tcttcttcat	ctgtgccctc	ctgaggttca	tctggtgctt	ccagagcatc	cacacagcca	7740
cgggcctgaa	ggatcgcagc	aaccagtact	accgcaggca	gtacgagaaa	gagagcgtgg	7800
gcctggccct	ccactggggc	ctgaaggcgt	tgttctacta	cttttatatg	ccaagcttct	7860
tgaccggact	catggtgttt	ttcgtgtccg	agttgcttgg	gggcttcggc	atcgccatcg	7920
tgggtgttcat	gaaccactac	cccctggaga	agatccagga	ctcgggtgtg	gacggccacg	7980
gcttttgccg	cggccagatt	cacgaaacga	tgaacgtcca	gcggggactc	gtcacggact	8040
ggttcttcgg	tgggctgaat	taccaaatacg	agcaccacct	gtggccgacg	ctgccccggc	8100
acaacctgac	ggcggccagc	atcaaagtgg	agcagttgtg	caagaagcac	aacttgccgt	8160

atcgcagccc cccaatgctg gagggggtgg gcatcctgat cagctacctg ggcacctttg 8220
 cccgcatggg ggcaaaggcc gacaaggcgt aagc 8254

<210> 37
 <211> 8254
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pY177

<400> 37
 ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa 60
 gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tgggtgcgagg atatagcaac 120
 ggatatttat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta 180
 aacatactgt acatactcat actcgtaccc ggcaacggtt tcaacttgagt gcagtggcta 240
 gtgctcttac tcgtacagtg tgcaatactg cgtatcatag tctttgatgt atatcgtatt 300
 cattcatgtt agttgcgtac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 360
 agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct 420
 gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 480
 gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 540
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 600
 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 660
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 720
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 780
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 840
 gggaagcgtg gcgctttctc atagctcaag ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 900
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatac 960
 cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 1020
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 1080
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgetgaagcc 1140
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 1200
 cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 1260
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 1320

tttggatcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag	1380
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat	1440
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	1500
cgctgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	1560
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	1620
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	1680
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	1740
tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca	1800
acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg	1860
tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatgg ttatggcagc	1920
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	1980
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc	2040
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	2100
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	2160
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	2220
aaaaacagga aggcataatg ccgcataaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat	2280
actcactatc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	2340
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	2400
ccgaaaagtg ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatca agcgcggcgg gtgtgggtgg	2460
tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt	2520
cccttccttt ctgccacgt tcgcccgtt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc	2580
tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga	2640
tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacgggtttt cgcccttga cgttgagtc	2700
cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggt	2760
ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggtta aaaatgagct	2820
gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgcttaca tttccattcg	2880
ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaagg cgatcgggtg gggcctcttc gctattacgc	2940
cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc	3000

cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa	3060
ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgat ggtgtcgata agcttgatat cgaattcatg	3120
tcacacaaac cgatcttcgc ctcaaggaaa cctaattcta catccgagag actgccgaga	3180
tccagtctac actgattaat tttcggggcca ataatttaaa aaaatcgtgt tatataatat	3240
tatatgtatt atatatatac atcatgatga tactgacagt catgtcccat tgctaaatag	3300
acagactcca tctgccgcct ccaactgatg ttctcaatat ttaaggggtc atctcgcatt	3360
gtttaataat aaacagactc catctaccgc ctccaaatga tgttctcaaa atatatgtga	3420
tgaacttatt ttattactt agtattatta gacaacttac ttgctttatg aaaaacactt	3480
cctatthaggt aaacaattta taatggcagt tcgttcattt aacaatttat gtagaataaa	3540
tgttataaat gcgtatggga aatcttaaat atggatagca taaatgatat ctgcattgcc	3600
taattcgaaa tcaacagcaa cgaaaaaat cccttgtaca acataaatag tcatcgagaa	3660
atatcaacta tcaaagaaca gctattcaca cgttactatt gagattatta ttggacgaga	3720
atcacacact caactgtctt tctctcttct agaaatacag gtacaagtat gtactattct	3780
cattgttcat acttctagtc atttcatccc acatattcct tggatttctc tccaatgaat	3840
gacattctat cttgcaaatt caacaattat aataagatat accaaagtag cggatatagt	3900
gcaatcaaaa agcttctctg gtgtgcttct cgtattttatt ttatttctaa tgatccatta	3960
aagggtatata ttattttctt gttatataat ccttttggtt attacatggg ctggatacat	4020
aaagggtattt tgatttaatt ttttgcttaa attcaatccc cctcgttca gtgtcaactg	4080
taatggtagg aaattaccat acttttgaag aagcaaaaaa aatgaaagaa aaaaaaatc	4140
gtatttccag gttagacgtt ccgcagaatc tagaatgcgg tatgcggtac attgttcttc	4200
gaacgtaaaa gttgcgctcc ctgagatatt gtacattttt gcttttaca gtacaagtac	4260
atcgtacaac tatgtactac tgttgatgca tccacaacag tttgttttgt ttttttttgt	4320
tttttttttt tctaattgatt cattaccgct atgtatacct acttgactt gtagtaagcc	4380
gggttattgg cgttcaatta atcatagact tatgaatctg cacggtgtgc gctgcgagtt	4440
acttttagct tatgcatgct acttgggtgt aatattggga tctgttcgga aatcaacgga	4500
tgctcaatcg atttcgacag taattaatta agtcatacac aagtcagctt tcttcgagcc	4560
tcatataagt ataagtagtt caacgtatta gcactgtacc cagcatctcc gtatcgagaa	4620
acacaacaac atgccccatt ggacagatca tgcggataca caggttgtgc agtatcatac	4680

atactcgatc agacaggtcg tctgaccatc atacaagctg aacaagcgct ccatacttgc	4740
acgctctcta tatacacagt taaattacat atccatagtc taacctctaa cagttaatct	4800
tctggtaagc ctcccagcca gccttctggt atcgcttggc ctctcaata ggatctcggt	4860
tctggccgta cagacctcgg ccgacaatta tgatatccgt tccggtagac atgacatcct	4920
caacagttcg gtactgctgt ccgagagcgt ctcccttgtc gtcaagaccc accccggggg	4980
tcagaataag ccagtcctca gagtcgcct taggtcgggt ctgggcaatg aagccaacca	5040
caaactcggg gtcggatcgg gcaagctcaa tgggtctgct ggagtactcg ccagtggcca	5100
gagagccctt gcaagacagc tcggccagca tgagcagacc tctggccagc ttctcggttg	5160
gagaggggac taggaactcc ttgtactggg agttctcgta gtcagagacg tcctccttct	5220
tctgttcaga gacagtttcc tcggcaccag ctgcgaggcc agcaatgatt ccggttccgg	5280
gtacaccgtg ggcgttggtg atatcggacc actcggcgat tcggtgacac cgttactggt	5340
gcttgacagt gttgccaata tctgcgaact ttctgtctc gaacaggaag aaaccgtgct	5400
taagagcaag ttccttgagg gggagcacag tgccggcgta ggtgaagtcg tcaatgatgt	5460
cgatatgggt tttgatcatg cacacataag gtccgacctt atcggcaagc tcaatgagct	5520
ccttggtggt ggtaacatcc agagaagcac acaggttggt tttcttggt gccacgagct	5580
tgagcactcg agcggcaaag gcggaactgt ggacgttagc tcgagcttcg taggagggca	5640
ttttggtggt gaagaggaga ctgaaataaa tttagtctgc agaacttttt atcggaacct	5700
tatctggggc agtgaagtat atgttatggt aatagttacg agttagtga acttatagat	5760
agactggact atacggctat cggtccaaat tagaaagaac gtcaatggct ctctggcgct	5820
cgcctttgcc gacaaaaatg tgatcatgat gaaagccagc aatgacgttg cagctgatat	5880
tgttgtcggc caaccgcgc gaaaacgcag ctgtcagacc cacagcctcc aacgaagaat	5940
gtatcgtcaa agtgatccaa gcacactcat agttggagtc gtactccaaa ggcggcaatg	6000
acgagtcaga cagatactcg tcgacgttta aacagtgtac gcagatctac tatagaggaa	6060
catttaaatt gccccggaga agacggccag gccgcctaga tgacaaattc aacaactcac	6120
agctgacttt ctgccattgc cactaggggg gggccttttt atatggccaa gccaagctct	6180
ccacgtcggg tgggctgcac ccaacaataa atgggtaggg ttgcaccaac aaagggatgg	6240
gatggggggg agaagatacg aggataacgg ggctcaatgg cacaataag aacgaatact	6300
gccattaaga ctcgatgatcc agcgactgac accattgcat catctaaggg cctcaaaact	6360

acctcggaac tgctgcgctg atctggacac cacagagggtt ccgagcactt taggttgcaac	6420
caaagtgtccc accaggtgca ggcagaaaac gctggaacag cgtgtacagt ttgtcttaac	6480
aaaaagtgag ggcgctgagg tcgagcaggg tgggtgtgact tgttatagcc tttagagctg	6540
cgaaagcgcg tatggatttg gctcatcagg ccagattgag ggtctgtgga cacatgtcat	6600
gttagtgtac ttcaatcgcc ccctggatat agccccgaca ataggccgtg gcctcatitt	6660
tttgcccttc gcacatttcc attgctcgat acccacacct tgcttctcct gcacttgcca	6720
accttaatac tggtttacat tgaccaacat cttacaagcg gggggcttgt ctaggggtata	6780
tataaacagt ggctctccca atcggttgcc agtctctttt ttcctttctt tccccacaga	6840
ttcgaaatct aaactacaca tcacagaatt ccgagccgtg agtatccacg acaagatcag	6900
tgctgagacg acgcgttttg tgtaatgaca caatccgaaa gtcgctagca acacacactc	6960
tctacacaaa ctaaccacgc tctggtacca tggtgaaaag gccagcactt ccgctgaccg	7020
ttgatggtgt cacctatgat gtgtctgcct ggttgaaacca tcatccaggg ggtgctgaca	7080
tcattgagaa ctaccgcggt cgtgatgcca ctgatgtctt tatggttatg cactctgaaa	7140
atgctgtgag taaactaaga aggatgccta tcatggaacc atcatctcca ctgacgccta	7200
cgccaccgaa acccaactca gacgaaccgc aggaggattt ccgcaagctc cgagatgagc	7260
tcatcgagc aggaatgttc gacgcatcac cgatgtggta cgcatataag acgctcagta	7320
cgctgggcct cggggctctc gcggtgctat tgatgacca gtggcactgg tacctcgctg	7380
gggcaatcgt gttgggcatt cacttccaac aaatggggtt gttgtcgac gatatctgcc	7440
accatcagct gttcaaggac cgatcgatca acaacgccat cggcttgctt ttcgggaacg	7500
tcttgcaagg gttctctgtg acctggtgga aggacaggca caatgcacac cactccgcca	7560
ccaacgtgca aggccacgac cccgacattg acaacctgcc gctgctggca tggccaagg	7620
aggacgtgga gagggccggc ccgttctcac ggcggatgat caagtaccag caatactact	7680
tcttcttcat ctgtgccctc ctgagggttca tctggtgctt ccagagcatc cacacagcca	7740
cgggcctgaa ggatcgagc aaccagtact accgcaggca gtacgagaaa gagagcgtgg	7800
gcctggccct ccactggggc ctgaaggcgt tgttctacta cttttatatg ccaagcttct	7860
tgaccggact catggtgttt ttcgtgtccg agttgcttgg gggcttcggc atcgccatcg	7920
tgggtgttcat gaaccactac cccctggaga agatccagga ctcggtgtgg gacggccacg	7980
gcttttgcgc cggccagatt cacgaaacga tgaacgtcca gcggggactc gtcacggact	8040

ggttcttcgg tgggctgaat taccaaatcg agcaccacct gtggccgacg ctgccccggc 8100
 acaacctgac ggcgccagc atcaaagtgg agcagttgtg caagaagcac aacttgccgt 8160
 atcgagccc cccaatgctg gaggggtgg gcacctgat cagctacctg ggcaccttg 8220
 cccgcatggt ggcaaaggcc gacaaggcgt aagc 8254

<210> 38

<211> 8254

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo pY178

<400> 38

ggccgcaagt gtggatggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa 60
 gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tggcgagag atatagcaac 120
 ggatatttat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta 180
 aacatactgt acatactcat actcgtaacc ggcaacggtt tcaacttgagt gcagtggcta 240
 gtgctcttac tcgtacagtg tgcaatactg cgtatcatag tctttgatgt atatcgatt 300
 cattcatgtt agttgcgtac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 360
 agtgagctaa ctacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct 420
 gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcggg agaggcggtt tgcgtattgg 480
 gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 540
 ggtatcagct cactcaaagg cggtataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 600
 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 660
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 720
 gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 780
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 840
 gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt 900
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttatac 960
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 1020
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg 1080
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 1140
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 1200

cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	1260
tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	1320
tttggtcattg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaatt	aaaaatgaag	1380
ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttgggtc	gacagttacc	aatgcttaat	1440
cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	1500
cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggcccagtg	ctgcaatgat	1560
accgcgagac	ccacgctcac	cggtccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	1620
ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaattgttg	1680
ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	1740
tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcgtt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	1800
acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	aaagcggtta	gctccttcgg	1860
tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	tcactcatgg	ttatggcagc	1920
actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	1980
ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgtc	2040
aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	2100
ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	agatccagtt	cgatgtaacc	2160
cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	accagcgttt	ctgggtgagc	2220
aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	gcgacacgga	aatgttgaat	2280
actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	2340
cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	gcacatttcc	2400
ccgaaaagtg	ccacctgacg	cgccctgtag	cggcgcatca	agcgcgcg	gtgtggtggt	2460
tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccctagcg	cccgtctctt	tcgttttctt	2520
cccttccttt	ctcgccacgt	tcgcccgtt	tccccgtcaa	gctctaaatc	gggggctccc	2580
tttagggttc	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	2640
tggttcacgt	agtgggcat	cgccctgata	gacggttttt	cgccctttga	cgttggagtc	2700
cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggg	2760
ctattctttt	gatttataag	ggattttgcc	gatttcggcc	tattgggttaa	aaaatgagct	2820
gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattttta	caaaatatta	acgcttacia	tttccattcg	2880

ccattcaggc	tgcgcaactg	ttgggaaggg	cgatcgggtgc	gggcctcttc	gctattacgc	2940
cagctggcga	aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	agggttttcc	3000
cagtcacgac	gttgtaaaac	gacgggccagt	gaattgtaat	acgactcact	atagggcgaa	3060
ttgggtaccg	ggccccccct	cgaggtcgat	ggtgtcgata	agcttgatat	cgaattcatg	3120
tcacacaaac	cgatcttcgc	ctcaaggaaa	cctaattcta	catccgagag	actgccgaga	3180
tccagtctac	actgattaat	tttcgggccca	ataatttaaa	aaaatcgtgt	tatataatat	3240
tatatgtatt	atatatatac	atcatgatga	tactgacagt	catgtcccat	tgctaaatag	3300
acagactcca	tctgccgcct	ccaactgatg	ttctcaatat	ttaaggggtc	atctcgcatt	3360
gtttaataat	aaacagactc	catctaccgc	ctccaaatga	tgttctcaaa	atatattgta	3420
tgaacttatt	tttattactt	agtattatta	gacaacttac	ttgctttatg	aaaaacactt	3480
cctatttagg	aaacaattta	taatggcagt	tcgttcattt	aacaatttat	gtagaataaa	3540
tggtataaat	gcgtatggga	aatcttaaat	atggatagca	taaatgatat	ctgcattgcc	3600
taattcgaaa	tcaacagcaa	cgaaaaaaat	cccttgtaca	acataaatag	tcatcgagaa	3660
atatcaacta	tcaaagaaca	gctattcaca	cgttactatt	gagattatta	ttggacgaga	3720
atcacacact	caactgtctt	tctctcttct	agaaatacag	gtacaagtat	gtactattct	3780
cattgttcat	acttctagtc	atttcatccc	acatattcct	tggatttctc	tccaatgaat	3840
gacattctat	cttgcaaatt	caacaattat	aataagatat	accaaagtag	cggatatagt	3900
gcaatcaaaa	agcttctctg	gtgtgcttct	cgtatttatt	tttattctaa	tgatccatta	3960
aaggatatata	tttatttctt	gttatataat	ccttttgttt	attacatggg	ctggatacat	4020
aaaggatattt	tgatttaatt	ttttgcttaa	attcaatccc	ccctcgttca	gtgtcaactg	4080
taatggtagg	aaattaccat	acttttgaag	aagcaaaaaa	aatgaaagaa	aaaaaaaaatc	4140
gtatttccag	gtagacggt	ccgcagaatc	tagaatgcgg	tatgcggtac	attgttcttc	4200
gaacgtaaaa	gttgcgctcc	ctgagatatt	gtacattttt	gctttttaca	gtacaagtac	4260
atcgtacaac	tatgtactac	tgttgatgca	tccacaacag	tttgttttgt	ttttttttgt	4320
tttttttttt	tctaattgatt	cattacogct	atgtatacct	acttgtactt	gtagtaagcc	4380
gggttattgg	cgttcaatta	atcatagact	tatgaatctg	cacgggtgtgc	gctgcgagtt	4440
acttttagct	tatgcatgct	acttgggtgt	aatattggga	tctgttcgga	aatcaacgga	4500
tgctcaatcg	atttcgacag	taattaatta	agtcatacac	aagtcagctt	tcttcgagcc	4560

tcatataagt	ataagtagtt	caacgtatta	gcactgtacc	cagcatctcc	gtatcgagaa	4620
acacaacaac	atgccccatt	ggacagatca	tgcggataca	caggttgtgc	agtatcatac	4680
atactcgatc	agacaggctg	tctgaccatc	atacaagctg	aacaagcgct	ccatacttgc	4740
acgctctcta	tatacacagt	taaattacat	atccatagtc	taacctctaa	cagttaatct	4800
tctggtaagc	ctcccagcca	gccttctggt	atcgcttggc	ctcctcaata	ggatctcggt	4860
tctggccgta	cagacctcgg	ccgacaatta	tgatatccgt	tccggtagac	atgacatcct	4920
caacagttcg	gtactgctgt	ccgagagcgt	ctcccttgtc	gtcaagaccc	accccggggg	4980
tcagaataag	ccagtcctca	gagtcgccct	taggtcgggt	ctgggcaatg	aagccaacca	5040
caaactcggg	gtcggatcgg	gcaagctcaa	tggctctgctt	ggagtactcg	ccagtggcca	5100
gagagccctt	gcaagacagc	tcggccagca	tgagcagacc	tctggccagc	ttctcgttgg	5160
gagaggggac	taggaactcc	ttgtactggg	agttctcgta	gtcagagacg	tcctccttct	5220
tctgttcaga	gacagtttcc	tcggcaccag	ctcgcaggcc	agcaatgatt	ccggttccgg	5280
gtacaccgtg	ggcgttggtg	atatcggacc	actcggcgat	tcggtgacac	cggtactggt	5340
gcttgacagt	gttgccaata	tctgcgaact	ttctgtcctc	gaacaggaag	aaaccgtgct	5400
taagagcaag	ttccttgagg	gggagcacag	tgccggcgta	ggtgaagtcg	tcaatgatgt	5460
cgatatgggt	tttgatcatg	cacacataag	gtccgacctt	atcggcaagc	tcaatgagct	5520
ccttggtggt	ggtaacatcc	agagaagcac	acaggttggt	tttcttggct	gccacgagct	5580
tgagcactcg	agcggcaaa	gcggacttgt	ggacgttagc	tcgagcttcg	taggagggca	5640
ttttggtggt	gaagaggaga	ctgaaataaa	tttagtctgc	agaacttttt	atcggaacct	5700
tatctggggc	agtgaagtat	atgttatggt	aatagttacg	agttagttga	acttatagat	5760
agactggact	atacggctat	cgttccaaat	tagaaagaac	gtcaatggct	ctctgggcgt	5820
cgcctttgcc	gacaaaaatg	tgatcatgat	gaaagccagc	aatgacgttg	cagctgatat	5880
tgttgctcggc	caaccgcgcc	gaaaacgcag	ctgtcagacc	cacagcctcc	aacgaagaat	5940
gtatcgtcaa	agtgatccaa	gcacactcat	agttggagtc	gtactccaaa	ggcggcaatg	6000
acgagtcaga	cagatactcg	tcgacgttta	aacagtgtac	gcagatctac	tatagaggaa	6060
catttaaatt	gccccggaga	agacggccag	gccgcctaga	tgacaaattc	aacaactcac	6120
agctgacttt	ctgccattgc	cactaggggg	gggccttttt	atatggccaa	gccaagctct	6180
ccacgtcggg	tgggctgcac	ccaacaataa	atgggtaggg	ttgcaccaac	aaagggatgg	6240

gatggggggt	agaagatacg	aggataacgg	ggctcaatgg	cacaaataag	aacgaataact	6300
gccattaaga	ctcgtgatcc	agcgactgac	accattgcat	catctaaggg	cctcaaaact	6360
acctcggaac	tgctgcgctg	atctggacac	cacagaggtt	ccgagcactt	taggttgac	6420
caaatgtccc	accaggtgca	ggcagaaaac	gctggaacag	cgtgtacagt	ttgtcttaac	6480
aaaaagtgag	ggcgctgagg	tcgagcaggg	tgggtgtgact	tgttatagcc	tttagagctg	6540
cgaaagcgcg	tatggatttg	gctcatcagg	ccagattgag	ggtctgtgga	cacatgtcat	6600
gtagtgttac	ttcaatcgcc	ccttgatat	agccccgaca	ataggccgtg	gcctcatttt	6660
tttgccttcc	gcacatttcc	attgctcgat	accacacact	tgcttctcct	gcacttgcca	6720
accttaatac	tggtttacat	tgaccaacat	cttacaagcg	gggggcttgt	ctagggtata	6780
tataaacagt	ggctctccca	atcggttgcc	agtctctttt	ttcctttctt	tccccacaga	6840
ttcgaaatct	aaactacaca	tcacagaatt	ccgagccgtg	agtatccacg	acaagatcag	6900
tgctcgagacg	acgcgttttg	tgtaatgaca	caatccgaaa	gtcgctagca	acacacactc	6960
tctacacaaa	ctaaccgcagc	tctggtacca	tggtgaaaag	gccagcactt	ccgctgaccg	7020
ttgatggtgt	cacctatgat	gtgtctgcct	ggttgaacca	tcatccaggg	ggtgctgaca	7080
tcattgagaa	ctaccgcggt	cgtgatgcca	ctgatgtctt	tatggttatg	cactctgaaa	7140
atgctgtgag	taaactaaga	aggatgccta	tcatggaacc	atcatctcca	ctgacgccta	7200
cgccaccgaa	acccaactca	gacgaaccgc	aggaggattt	ccgcaagctc	cgagatgagc	7260
tcatcgcagc	aggaatgttc	gacgcacac	cgatgtggta	cgcatataag	acgctcagta	7320
cgctgggcct	cggggtcctc	gcggtgctat	tgatgacca	gtggcactgg	tacctcgtcg	7380
gggcaatcgt	gttgggcatt	cacttccaac	aatggggttg	gttgtcgcac	gatatctgcc	7440
accatcagct	gttcaaggac	cgatcgatca	acaacgccat	cggcttgctt	ttcgggaacg	7500
tcttgcaagg	gttctctgtg	acctggtgga	aggacaggca	caatgcacac	cactccgcca	7560
ccaacgtgca	aggccacgac	ccgacattg	acaacctgcc	gctgctggca	tgggtccaagg	7620
aggacgtgga	gagggccggc	ccgttctcac	ggcggatgat	caagtaccag	caatactact	7680
tcttcttcat	ctgtgccctc	ctgaggttca	tctggtgctt	ccagagcatc	cacacagcca	7740
agggcctgaa	ggatcgacgc	aaccagtact	accgcaggca	gtacgagaaa	gagagcgtgg	7800
gcctggccct	ccactggggc	ctgaaggcgt	tgttctacta	cttttatatg	ccaagcttct	7860
tgaccggact	catgggtgtt	ttcgtgtccg	agttgcttgg	gggcttcggc	atcgccatcg	7920

tgggtgttcat gaaccactac cccctggaga agatccagga ctcggtgtgg gacggccacg 7980
 gctttttgcgc cggccagatt cacgaaacga tgaacgtcca gcggggactc gtcacggact 8040
 gggttcttcgg tgggctgaat taccaaatacg agcaccacct gtggccgacg ctgccccggc 8100
 acaacctgac ggcggccagc atcaaagtgg agcagttgtg caagaagcac aacttgccgt 8160
 atcgagccc cccaatgctg gaggggggtg gcactctgat cagctacctg ggcacctttg 8220
 cccgcatggg ggcaaaggcc gacaaggcgt aagc 8254

<210> 39
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> *Euglena gracilis*

<400> 39
 atggagggtg tgaatgaaat agtctcaatt gggcaggaag ttttaccxaa agttgattat 60
 gcccaactct ggagtgatgc cagtcaactgt gaggtgcttt acttgtccat cgcatttgtc 120
 atcttgaagt tcactcttgg cccocttggg ccaaaaggct agtctcgtat gaagtttgtt 180
 ttcaccaatt acaaccttct catgtccatt tattcgttgg gatcattcct ctcaatggca 240
 tatgccatgt acaccatcgg tgttatgtct gacaactgcg agaaggcttt tgacaacaac 300
 gtcttcagga tcaccacgca gttgttctat ttgagcaagt tcctggagta tattgactcc 360
 ttctatttgc cactgatggg caagcctctg acctggttgc aattcttcca tcatttgggg 420
 gcaccgatgg atatgtggct gttctataat taccgaaatg aagctgtttg gatTTTTgtg 480
 ctggtgaatg gtttcatcca ctggatcatg tacggttatt attggaccag attgatcaag 540
 ctgaagttcc ccatgccaaa atccctgatt acatcaatgc agatcattca attcaatgtt 600
 ggtttctaca ttgtctggaa gtacaggaac attccctgtt atcgccaaga tgggatgagg 660
 atgtttggct ggttcttcaa ttacttttat gttggcacag tcttgtgttt gttcttgaat 720
 ttctatgtgc aaacgtatat cgtcaggaag cacaaggag ccaaaaagat tcagtga 777

<210> 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer oEugEL1

<400> 40
 agcggccgca ccatggagggt ggtgaatgaa 30

<210> 41

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> primer oEugEL1-2

<400> 41
 tgcggccgct cactgaatct ttttggtcc 30

<210> 42
 <211> 4311
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pKR906

<400> 42
 agcggccgca ccatggaggt ggtgaatgaa atagtctcaa ttgggcagga agttttaccc 60
 aaagttgatt atgcccact ctggagtgat gccagtcact gtgaggtgct ttacttgtcc 120
 atcgcatcttgc tcatcttgaa gttcactctt ggcccccttg gtccaaaagg tcagtctcgt 180
 atgaagtttg ttttcaccaa ttacaacctt ctcatgtcca tttattcggt gggtatcattc 240
 ctctcaatgg catatgccat gtacaccatc ggtgttatgt ctgacaactg cgagaaggct 300
 tttgacaaca acgtcttcag gatcaccacg cagttgttct atttgagcaa gttcctggag 360
 tatattgact ctttctatct gccactgatg ggcaagcctc tgacctggtt gcaattcttc 420
 catcatttggt gggcaccgat ggatatgtgg ctgttctata attaccgaaa tgaagctggt 480
 tggatttttg tgctgttgaa tggtttcatc cactggatca tgtacggtta ttattggacc 540
 agattgatca agctgaagtt ccccatgcc aatccctga ttacatcaat gcagatcatt 600
 caattcaatg ttggtttcta cattgtcttg aagtacagga acattccctg ttatcgccaa 660
 gatgggatga ggatgttttg ctggttcttc aattactttt atgttggcac agtcttgtgt 720
 ttgttcttga atttctatgt gcaaacgtat atcgtcagga agcacaaggg agccaaaaag 780
 attcagtgag cggccgcacc tgaattccag cacactggcg gccgttacta gtggatccga 840
 gctcggtagc aagcttgatg catagcttga gtattctaac gcgtcaccta aatagcttgg 900
 cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 960
 acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca 1020
 cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 1080
 attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttcogctt 1140

cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggtcg	ttcggtgctg	gagagcggtg	tcagctcact	1200
caaaggcggt	aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgaggaaag	aacatgtgag	1260
caaaaggcca	gcaaaagccc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	tttttccata	1320
ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	1380
cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	1440
ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	cgccttttct	cccttcggga	agcgtggcg	1500
tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	1560
gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccc	accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgct	1620
ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgcactggc	agcagccact	ggtaacagga	1680
ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	cagagttctt	gaagtgggtg	cctaactacg	1740
gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	1800
aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	ggtttttttg	1860
tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	1920
ctacggggtc	tgacgctcag	tggaaacgaa	actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	1980
tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	taaattaaaa	atgaagtttt	agcacgtgtc	2040
agtctgctc	ctcggccacg	aagtgcacgc	agttgccggc	cgggtcgcgc	agggcgaact	2100
cccgccccca	cggctgctcg	ccgatctcgg	tcattggccg	ccggaggcgc	tcccgggaagt	2160
tcgtggacac	gacctccgac	cactcggcgt	acagctcgct	caggccgcgc	accacacccc	2220
aggccagggt	gttgtccggc	accacctggt	cctggaccgc	gctgatgaac	agggtcacgt	2280
cgtcccgac	cacaccggcg	aagtcgtcct	ccacgaagtc	ccgggagaac	ccgagccggt	2340
cgggtccagaa	ctcgaccgct	ccggcgacgt	cgcgcgcggt	gagcaccgga	acggcactgg	2400
tcaacttggc	catggtggcc	ctcctcacgt	gctattattg	aagcatttat	cagggttatt	2460
gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	2520
gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgtat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	2580
gagaaaatac	cgcatcagga	aattgtaagc	gttaataatt	cagaagaact	cgtcaagaag	2640
gcgatagaag	gcgatgcgct	gcgaatcggg	agcggcgata	ccgtaaagca	cgaggaagcg	2700
gtcagcccat	tcgccgcaa	gctcttcagc	aatatcacgg	gtagccaacg	ctatgtcctg	2760
atagcgggtcc	gccacaccca	gccggccaca	gtcgatgaat	ccagaaaagc	ggccattttc	2820


```

caccatgata ttcggaagc aggcacgcc atgggtcacg acgagatcct cgccgtcggg 2880
catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg agcccctgat gctcttcgtc 2940
cagatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct cgatgcgatg 3000
tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc 3060
atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaaggtaga gatgacagga gatcctgccc 3120
cggcacttcg cccaatagca gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt cgagcacagc 3180
tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cttgcagttc 3240
attcagggca ccggacaggt cggctcttgac aaaaagaacc gggcgcccct gcgctgacag 3300
ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gccagtcac agccgaatag 3360
cctctccacc caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa 3420
cgatcctcat cctgtctctt gatcagagct tgatccctg cgccatcaga tccttggcgg 3480
cgagaaagcc atccagttta ctttgcaggg cttcccaacc ttaccagagg gcgccccagc 3540
tggcaattcc ggttcgcttg ctgtccataa aaccgcccag tctagctatc gccatgtaag 3600
cccactgcaa gctacctgct ttctctttgc gcttgcggtt tcccttgtcc agatagccca 3660
gtagctgaca ttcatccggg gtcagcaccg tttctgcgga ctggctttct acgtgaaaag 3720
gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgcctgac atttatattc cccagaacat 3780
cagggttaatg gcgtttttga tgtcattttc gcggtggctg agatcagcca cttcttcccc 3840
gataacggag accggcacac tggccatata ggtggtcatc atgcgccagc tttcatcccc 3900
gatatgcacc accgggtaaa gttcacggga gactttatct gacagcagac gtgcaactggc 3960
cagggggatc accatccgtc gcccggcgt gtcaataata tcaactctgta catccacaaa 4020
cagacgataa cggctctctc ttttataggt gtaaacctta aactgccgta cgtataggct 4080
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 4140
agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 4200
ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggccctct 4260
agatgcatgc tcgagcggcc gccagtgtaga tggatatctg cagaattcag g 4311

```

<210> 43

<211> 7085

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmideo pKR72

<400> 43

```

gtacggatcc gtcgacggcg cgcccgatca tccggatata gttcctcctt tcagcaaaaa    60
accctcaag acccgtttag aggccccaag gggttatgct agttattgct cagcgggtggc    120
agcagccaac tcagcttcct ttccggcttt gttagcagcc ggatcgatcc aagctgtacc    180
tcactattcc tttgccctcg gacgagtgtc ggggcgtcgg tttccactat cggcgagtac    240
ttctacacag ccatcgggtcc agacggccgc gcttctgcgg gcgatttgtg tacgcccagc    300
agtcccggtc ccggatcgga cgattgcgtc gcatcgaccc tgcgcccaag ctgcatcacc    360
gaaattgccg tcaaccaagc tctgatagag ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc    420
ccggagccgc ggcatcctg caagctccgg atgcctccgc tcgaagtagc gcgtctgctg    480
ctccatacaa gccaacccag gcctccagaa gaagatgttg gcgacctcgt attgggaatc    540
cccgaacatc gcctcgctcc agtcaatgac cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac    600
attgttgagg ccgaaatccg cgtgcacgag gtgccggact tcggggcagt cctcggccca    660
aagcatcagc tcatcgagag cctgcgcgac ggacgcactg acggtgtcgt ccatcacagt    720
ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat cgcgcatatg aaatcacgcc atgtagtgtg    780
ttgaccgatt ccttgcggtc cgaatgggcc gaaccgcgtc gtctggctaa gatcgccgcg    840
agcgatcgca tccatagcct ccgcgaccgg ctgcagaaca gcgggcagtt cggtttcagg    900
caggctcttc aacgtgacac cctgtgcaag gcgggagatg caataggtca ggctctcgt    960
gaattcccca atgtcaagca cttccggaat cgggagcgcg gccgatgcaa agtgccgata   1020
aacataacga tctttgtaga aaccatcggc gcagctatct accgcagga catatccagc   1080
ccctctaca tcgaagctga aagcacgaga ttcttcgccc tccgagagct gcatcaggtc   1140
ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa cttctcgaca gacgtcgcgg tgagttcagg   1200
cttttccatg ggtatatctc cttcttaaag ttaaacaaaa ttatttctag agggaaaccg   1260
ttgtggtctc cctatagtga gtcgatttaa tttcgcggga tcgagatcga tccaattcca   1320
atcccacaaa aatctgagct taacagcaca gttgctctc tcagagcaga atcgggtatt   1380
caacaccctc atatcaacta ctacgttgtg tataacggtc cacatgccgg tatatacgat   1440
gactgggggt gtacaaaggc ggcaacaaac ggcgttcccg gagttgcaca caagaaattt   1500
gccactatta cagaggcaag agcagcagct gacgcgtaca caacaagtca gcaaacagac   1560
aggttgaact tcatccccaa aggagaagct caactcaagc ccaagagctt tgctaaggcc   1620

```

ctaacaagcc	caccaaagca	aaaagccac	tggctcacgc	taggaaccaa	aaggcccagc	1680
agtgatccag	ccccaaaaga	gatctccttt	gccccggaga	ttacaatgga	cgatttcctc	1740
tatcttttacg	atctaggaag	gaagttcgaa	ggtgaagggtg	acgacactat	gttcaccact	1800
gataatgaga	aggttagcct	cttcaatttc	agaaagaatg	ctgaccacaca	gatgggttaga	1860
gaggcctacg	cagcaggtct	catcaagacg	atctaccoga	gtaacaatct	ccaggagatc	1920
aaataccttc	ccaagaaggt	taaagatgca	gtcaaaagat	tcaggactaa	ttgcatcaag	1980
aacacagaga	aagacatatt	tctcaagatc	agaagtacta	ttccagtatg	gacgattcaa	2040
ggcttgcttc	ataaaccaag	gcaagtaata	gagattggag	tctctaaaaa	ggtagttcct	2100
actgaatcta	aggccatgca	tggagtctaa	gattcaaatc	gaggatctaa	cagaactcgc	2160
cgtgaagact	ggcgaacagt	tcatacagag	tctttttacga	ctcaatgaca	agaagaaaat	2220
cttcgtcaac	atggtggagc	acgacactct	ggtctactcc	aaaaatgtca	aagatacagt	2280
ctcagaagac	caaagggcta	ttgagacttt	tcaacaaagg	ataatttcgg	gaaacctcct	2340
cggattccat	tgcccagcta	tctgtcactt	catcgaaagg	acagtagaaa	aggaaggtgg	2400
ctcctacaaa	tgccatcatt	gcgataaagg	aaaggctatc	attcaagatg	cctctgccga	2460
cagtgggtccc	aaagatggac	ccccaccac	gaggagcatc	gtggaaaaag	aagacgttcc	2520
aaccacgtct	tcaaagcaag	tggattgatg	tgacatctcc	actgacgtaa	gggatgacgc	2580
acaatcccac	tatccttcgc	aagacccttc	ctctatataa	ggaagttcat	ttcatttgga	2640
gaggacacgc	tcgagctcat	ttctctatta	cttcagccat	aacaaaagaa	ctcttttctc	2700
ttcttattaa	accatgaaaa	agcctgaact	caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	2760
cgaaaagttc	gacagcgtct	ccgacctgat	gcagctctcg	gagggcgaag	aatctcgtgc	2820
tttcagcttc	gatgtaggag	ggcgtggata	tgtcctgcgg	gtaaatagct	gcgccgatgg	2880
tttctacaaa	gatcgttatg	tttatcggca	ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	2940
agtgcctgac	attggggaat	tcagcgagag	cctgacctat	tgcattctccc	gccgtgcaca	3000
gggtgtcacg	ttgcaagacc	tgcctgaaac	cgaactgccc	gctgttctgc	agccggctcg	3060
ggaggccatg	gatgcgatcg	ctgcggccga	tcttagccag	acgagcgggt	tcggcccat	3120
cggaccgcaa	ggaatcggtc	aatacactac	atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgctga	3180
tccccatgtg	tatcactggc	aaactgtgat	ggacgacacc	gtcagtgcgt	ccgtcgcgca	3240
ggctctcgat	gagctgatgc	tttgggccga	ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	3300

cgcggttttc	ggctccaaca	atgtcctgac	ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	3360
ctggagcgag	gcgatgttcg	gggattccca	atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	3420
gccgtgggtg	gcttgtatgg	agcagcagac	gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	3480
tgcaggatcg	ccgcggctcc	gggcgtatat	gctccgcatt	ggtcttgacc	aactctatca	3540
gagcttggtt	gacggcaatt	tcgatgatgc	agcttgggcg	cagggtcgat	gcgacgcaat	3600
cgtccgatcc	ggagccggga	ctgtcgggcg	tacacaaatc	gcccgcagaa	gcgcggccgt	3660
ctggaccgat	ggctgtgtag	aagtactcgc	cgatagtggg	aaccgacgcc	ccagcactcg	3720
tccgagggca	aaggaatagt	gaggtacct	aagaaggagt	gcgtcgaagc	agatcgttca	3780
aacatttggc	aataaagttt	cttaagattg	aatcctgttg	ccggtcttgc	gatgattatc	3840
atataatttc	tgttgaatta	cgtaaagcat	gtaataatta	acatgtaatg	catgacgtta	3900
tttatgagat	gggtttttat	gattagagtc	ccgcaattat	acatttaata	cgcgatagaa	3960
aacaaaatat	agcgcgcaaa	ctaggataaa	ttatcgcgcg	cggtgtcatc	tatgttacta	4020
gatcgatgtc	gaatcgatca	acctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	4080
tttgcgatt	gggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgttcg	4140
gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	4200
ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	4260
ggccgcggtg	ctggcggttt	tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	4320
acgctcaagt	cagaggtggc	gaaaccgcac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	4380
tggaaagctc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	4440
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcaatgctca	cgctgtaggt	atctcagttc	4500
ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	ccccccgttc	agcccgaccg	4560
ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	4620
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	4680
gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	4740
tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaac	4800
caccgctggg	agcgggtggt	tttttggttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	4860
atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	ggggctctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	4920
acgttaaggg	attttgggtca	tgacattaac	ctataaaaaat	aggcgatatca	cgaggccctt	4980

t c g t c t c g c g	c g t t t c g g t g	a t g a c g g t g a	a a a c c t c t g a	c a c a t g c a g c	t c c c g g a g a c	5040
g g t c a c a g c t	t g t c t g t a a g	c g g a t g c c g g	g a g c a g a c a a	g c c c g t c a g g	g c g c g t c a g c	5100
g g g t g t t g g c	g g g t g t c g g g	g c t g g c t t a a	c t a t g c g g c a	t c a g a g c a g a	t t g t a c t g a g	5160
a g t g c a c c a t	a t g g a c a t a t	t g t c g t t a g a	a c g c g g c t a c	a a t t a a t a c a	t a a c c t t a t g	5220
t a t c a t a c a c	a t a c g a t t t a	g g t g a c a c t a	t a g a a c g g c g	c g c c a a g c t t	g t t g a a a c a t	5280
c c c t g a a g t g	t c t c a t t t t a	t t t t a t t t a t	t c t t t g c t g a	t a a a a a a a t a	a a a t a a a a g a	5340
a g c t a a g c a c	a c g g t c a a c c	a t t g c t c t a c	t g c t a a a a g g	g t t a t g t g t a	g t g t t t t a c t	5400
g c a t a a a t t a	t g c a g c a a a c	a a g a c a a c t c	a a a t t a a a a a	a t t t c c t t t g	c t t g t t t t t t	5460
t g t t g t c t c t	g a c t t g a c t t	t c t t g t g g a a	g t t g g t t g t a	t a a g g a t t g g	g a c a c c a t t g	5520
t c c t t c t t a a	t t t a a t t t t a	t t c t t t g c t g	a t a a a a a a a a	a a a t t t c a t a	t a g t g t t a a a	5580
t a a t a a t t t g	t t a a a t a a c c	a a a a a g t c a a	a t a t g t t t a c	t c t c g t t t a a	a t a a t t g a g a	5640
t t c g t c c a g c	a a g g c t a a a c	g a t t g t a t a g	a t t t a t g a c a	a t a t t t a c t t	t t t t a t a g a t	5700
a a a t g t t a t a	t t a t a a t a a a	t t t a t a t a c a	t a t a t t a t a t	g t t a t t t a t t	a t t a t t t t a a	5760
a t c c t t c a a t	a t t t t a t c a a	a c c a a c t c a t	a a t t t t t t t t	t t a t c t g t a a	g a a g c a a t a a	5820
a a t t a a a t a g	a c c c a c t t t a	a g g a t g a t c c	a a c c t t t a t a	c a g a g t a a g a	g a g t t c a a a t	5880
a g t a c c c t t t	c a t a t a c a t a	t c a a c t a a a a	t a t t a g a a a t	a t c a t g g a t c	a a a c c t t a t a	5940
a a g a c a t t a a	a t a a g t g g a t	a a g t a t a a t a	t a t a a a t g g g	t a g t a t a t a a	t a t a t a a a t g	6000
g a t a c a a a c t	t c t c t c t t t a	t a a t t g t t a t	g t c t c c t t a a	c a t c c t a a t a	t a a t a c a t a a	6060
g t g g g t a a t a	t a t a a t a t a t	a a a t g g a g a c	a a a c t t c t t c	c a t t a t a a t t	g t t a t g t c t t	6120
c t t a a c a c t t	a t g t c t c g t t	c a c a a t g c t a	a g g t t a g a a t	t g t t t a g a a a	g t c t t a t a g t	6180
a c a c a t t t g t	t t t t g t a c t a	t t t g a a g c a t	t c c a t a a g c c	g t c a c g a t t c	a g a t g a t t t a	6240
t a a t a a t a a g	a g g a a a t t t a	t c a t a g a a c a	a t a a g g t g c a	t a g a t a g a g t	g t t a a t a t a t	6300
c a t a a c a t c c	t t t g t t t a t t	c a t a g a a g a a	g t g a g a t g g a	g c t c a g t t a t	t a t a c t g t t a	6360
c a t g g t c g g a	t a c a a t a t t c	c a t g c t c t c c	a t g a g c t c t t	a c a c c t a c a t	g c a t t t t a g t	6420
t c a t a c t t g c	g g c c g c a g t a	t a t c t t a a a t	t c t t t a a t a c	g g t g t a c t a g	g a t a t t g a a c	6480
t g g t t c t t g a	t g a t g a a a a c	c t g g g c c g a g	a t t g c a g c t a	t t t a t a g t c a	t a g g t c t t g t	6540
t a a c a t g c a t	g g a c a t t t g g	c c a c g g g g t g	g c a t g c a g t t	t g a c g g g t g t	t g a a a t a a a c	6600
a a a a a t g a g g	t g g c g g a a g a	g a a t a c g a g t	t t g a g g t t g g	g t t a g a a a c a	a c a a a t g t g a	6660

```

gggctcatga tgggttgagt tggatgaatgt tttgggctgc tcgattgaca cctttgtgag 6720
tacgtgttgt tgtgcatggc ttttggggtc cagttttttt ttcttgacgc ggcgatcctg 6780
atcagctagt ggataagtga tgtccactgt gtgtgattgc gtttttgttt gaattttatg 6840
aacttagaca ttgctatgca aaggatactc tcattgtgtt ttgtcttctt ttgttccttg 6900
gctttttctt atgatccaag agactagtca gtgttggtggc attcgagact accaagatta 6960
attatgatgg gggaaggata agtaactgat tagtacggac tgttaccaa ttaattaata 7020
agcggcaaat gaagggcatg gatcaaaagc ttggatctcc tgcaggatct gcccggccgg 7080
atctc 7085

```

```

<210> 44
<211> 7873
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo pKR912

```

```

<400> 44
ggccgcaagt atgaactaaa atgcatgtag gtgtaagagc tcatggagag catggaatat 60
tgtatccgac catgtaacag tataataact gagctccatc tcaactcttc tatgaataaa 120
caaaggatgt tatgatatat taacactcta tctatgcacc ttattgttct atgataaatt 180
tcctcttatt attataaatc atctgaatcg tgacggctta tggaatgctt caaatagtag 240
aaaaacaaat gtgtactata agactttcta aacaattcta accttagcat tgtgaacgag 300
acataagtgt taagaagaca taacaattat aatggaagaa gtttgtctcc atttatatat 360
tatatattac ccacttatgt attatattag gatgttaagg agacataaca attataaaga 420
gagaagtttg tatccattta tatattatat actaccatt tatatattat acttatccac 480
ttatttaatg tctttataag gtttgatcca tgatatttct aatatttttag ttgatatgta 540
tatgaaaggg tactatttga actctcttac tctgtataaa ggttggatca tccttaaagt 600
gggtctattt aattttattg cttcttacag ataaaaaaaa aattatgagt tggtttgata 660
aaatattgaa ggatttaaaa taataataaa taacatataa tatatgtata taaatttatt 720
ataatataac atttatctat aaaaaagtaa atattgtcat aaatctatac aatcgtttag 780
ccttgctgga cgaatctcaa ttatttaaac gagagtaaac atatttgact ttttggttat 840
ttaacaaatt attatttaac actatatgaa attttttttt ttatcagcaa agaataaaaat 900
taaattaaga aggacaatgg tgtcccaatc cttatacaac caacttccac aagaaagtca 960

```

agtcagagac	aacaaaaaaaa	caagcaaagg	aaatttttta	atttgagttg	tcttgtttgc	1020
tgcataatth	atgcagtaaa	acactacaca	taaccctttt	agcagtagag	caatggttga	1080
ccgtgtgctt	agcttctttt	atthttattht	tttatcagca	aagaataaat	aaaataaaat	1140
gagacacttc	agggatgttt	caacaagctt	ggcgcgccgt	tctatagtgt	cacctaaatc	1200
gtatgtgtat	gatacataag	gttatgtatt	aattgtagcc	gcgttctaac	gacaatatgt	1260
ccatatggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	1320
acccgccaac	acccgctgac	gcgccctgac	gggcttgtct	gtccccgca	tccgcttaca	1380
gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttcaccg	tcatcaccga	1440
aacgcgcgag	acgaaagggc	ctcgtgatac	gcctatthtt	ataggttaat	gtcatgacca	1500
aatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	1560
gatcttcttg	agatccttht	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	aaaaaaccac	1620
cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	aagagctacc	aactctthtt	ccgaaggtaa	1680
ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	1740
accacttcaa	gaactctgta	gcaccgcta	catacctcgc	tctgctaata	ctgttaccag	1800
tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttac	1860
cggataaggc	gcagcggctg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	agcttggagc	1920
gaacgacctt	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	gccacgcttc	1980
ccgaaggag	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaaca	ggagagcgca	2040
cgaggagct	tccaggggga	aacgcctggt	atctthtatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	2100
tctgacttga	gcgtcgatth	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	2160
ccagcaacgc	ggcctthttt	cggttcctgg	cctthtgctg	gcctthtgct	cacatgttct	2220
ttcctgcgtt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcctthgag	tgagctgata	2280
ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	2340
gcccaatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	tcattaatgc	aggttgatcg	2400
attcgacatc	gatctagtaa	catagatgac	accgcgcgcg	ataatthtata	ctagthtgcg	2460
cgctatatth	tgtthttctat	cgcgtattaa	atgtataatt	gcgggactct	aatcataaaa	2520
acccatctca	taaataacgt	catgcattac	atgttaatta	ttacatgctt	aacgtaattc	2580
aacagaaatt	atatgataat	catcgcaaga	ccggcaacag	gattcaatct	taagaaactt	2640

tattgccaaa	tgtttgaacg	atctgcttcg	acgcactcct	tcttttaggta	cctcactatt	2700
cctttgccct	cggacgagtg	ctggggcgtc	ggtttccact	atcggcgagt	acttctacac	2760
agccatcggt	ccagacggcc	gcgcttctgc	gggcgatttg	tgtacgcccc	acagtcccg	2820
ctccggatcg	gacgattgcg	tcgcatcgac	cctgcgcca	agctgcatca	tcgaaattgc	2880
cgtcaaccaa	gctctgatag	agttggtcaa	gaccaatgcg	gagcatatac	gcccggagcc	2940
gcggcgatcc	tgcaagctcc	ggatgcctcc	gctcgaagta	gcgcgtctgc	tgctccatac	3000
aagccaacca	cggcctccag	aagaagatgt	tggcgacctc	gtattgggaa	tccccgaaca	3060
tcgcctcgct	ccagtcaatg	accgctgtta	tgcggccatt	gtccgtcagg	acattgttgg	3120
agccgaaatc	cgctgcacg	aggtgccgga	cttcggggca	gtcctcggcc	caaagcatca	3180
gctcatcgag	agcctgcgcg	acggacgcac	tgacggtgtc	gtccatcaca	gtttgccagt	3240
gatacacatg	gggatcagca	atcgcgcata	tgaaatcacg	ccatgtagtg	tattgaccga	3300
ttccttgccg	tccgaatggg	ccgaaccgcg	tcgtctggct	aagatcggcc	gcagcgatcg	3360
catccatggc	ctccgcgacc	ggctgcagaa	cagcgggcag	ttcggtttca	ggcagggtctt	3420
gcaacgtgac	accctgtgca	cggcgggaga	tgcaataggt	caggctctcg	ctgaattccc	3480
caatgtcaag	cacttccgga	atcgggagcg	cggccgatgc	aaagtgccga	taaacataac	3540
gatctttgta	gaaaccatcg	gcgcagctat	ttaccgcgag	gacatatcca	cgccctccta	3600
catcgaagct	gaaagcacga	gattcttcgc	cctccgagag	ctgcatcagg	tcggagacgc	3660
tgtcgaactt	ttcgatcaga	aacttctoga	cagacgtcgc	ggtgagttca	ggctttttca	3720
tggtttaata	agaagagaaa	agagtctttt	tgttatggct	gaagtaatag	agaaatgagc	3780
tcgagcgtgt	cctctccaaa	tgaaatgaac	ttccttatat	agaggaagg	tcttgccaag	3840
gatagtggga	ttgtgcgtca	tcccttacgt	cagtggagat	gtcacatcaa	tccacttgct	3900
ttgaagacgt	ggttgaacg	tcttcttttt	ccacgatgct	cctcgtgggt	gggggtccat	3960
ctttgggacc	actgtcggca	gaggcatctt	gaatgatagc	ctttccttta	tcgcaatgat	4020
ggcatttgta	ggagccacct	tccttttcta	ctgtcctttc	gatgaagtga	cagatagctg	4080
ggcaatggaa	tccgaggagg	tttcccgaaa	ttatcctttg	ttgaaaagtc	tcaatagccc	4140
tttggctctc	tgagactgta	tctttgacat	ttttggagta	gaccagagtg	tcgtgctcca	4200
ccatgttgac	gaagattttc	ttcttgtcat	tgagtcgtaa	aagactctgt	atgaactggt	4260
cgccagtctt	cacggcgagt	tctgttagat	cctcgatttg	aatcttagac	tccatgcatg	4320

gccttagatt	cagtaggaac	tacotTTTTa	gagactccaa	tctctattac	ttgccttggt	4380
ttatgaagca	agccttgaat	cgtccatact	ggaatagtag	ttctgatctt	gagaaatatg	4440
tctttctctg	tgttcttgat	gcaattagtc	ctgaatcttt	tgactgcata	tttaaccttc	4500
ttgggaaggt	atttgatctc	ctggagattg	ttactcgggt	agatcgctct	gatgagacct	4560
gctgcgtagg	cctctctaac	catctgtggg	tcagcattct	ttctgaaatt	gaagaggcta	4620
accttctcat	tatcagtggg	gaacatagtg	tcgtcacctt	caccttcgaa	cttccttcct	4680
agatcgtaaa	gatagaggaa	atcgctcatt	gtaatctccg	gggcaaagga	gatctctttt	4740
ggggctggat	cactgctggg	ccttttggtt	cctagcgtga	gccagtgggc	tttttgcttt	4800
ggtgggcttg	ttagggcctt	agcaaagctc	ttgggcttga	gttgagcttc	tcctttgggg	4860
atgaagttca	acctgtctgt	ttgctgactt	gttgtgtacg	cgtcagctgc	tgctcttgcc	4920
tctgtaatag	tggcaaattt	cttgtgtgca	actccgggaa	cgccgtttgt	tgccgccttt	4980
gtacaacccc	agtcacgta	tataccggca	tgtggaccgt	tatacacaac	gtagtagttg	5040
atatgagggg	gttgaatacc	cgattctgct	ctgagaggag	caactgtgct	gttaagctca	5100
gatttttttg	ggattggaat	tggatcgatc	tcgatcccg	gaaattaata	cgactcacta	5160
tagggagacc	acaacgggtt	ccctctagaa	ataattttgt	ttaactttaa	gaaggagata	5220
tacccatgga	aaagcctgaa	ctcaccgcga	cgtctgtcga	gaagtttctg	atcgaaaagt	5280
tcgacagcgt	ctccgacctg	atgcagctct	cggagggcga	agaatctcgt	gctttcagct	5340
tcgatgtagg	agggcgtgga	tatgtcctgc	gggtaaatag	ctgcgccgat	ggtttctaca	5400
aagatcgtaa	tgtttatcgg	cactttgcat	cggccgcgct	cccgattccg	gaagtgcctg	5460
acattgggga	attcagcgag	agcctgacct	attgcatctc	ccgccgtgca	caggggtgtca	5520
cgttgcaaga	cctgcctgaa	accgaactgc	ccgctgttct	gcagccgggc	gcggaggcta	5580
tggatgcgat	cgctgcggcc	gatcttagcc	agacgagcgg	gttcggccca	ttcggaccgc	5640
aaggaatcgg	tcaatacact	acatggcgtg	atttcatatg	cgcgattgct	gatcccatg	5700
tgtatcactg	gcaaactgtg	atggacgaca	ccgtcagtgc	gtccgtcgcg	caggctctcg	5760
atgagctgat	gctttgggcc	gaggactgcc	ccgaagtccg	gcacctcggt	cacgcggatt	5820
tcggctccaa	caatgtcctg	acggacaatg	gccgcataac	agcggtcatt	gactggagcg	5880
aggcgatgtt	cggggattcc	caatacgagg	tcgccaacat	cttcttctgg	aggccgtggt	5940
tggcttgat	ggagcagcag	acgcgctact	tcgagcggag	gcatccggag	cttgcaggat	6000

cgccgcggct	ccgggcgtat	atgctccgca	ttggtcttga	ccaactctat	cagagcttgg	6060
ttgacggcaa	tttcgatgat	gcagcttggg	cgcagggtcg	atgcgacgca	atcgtccgat	6120
ccggagccgg	gactgtcggg	cgtacacaaa	tcgcccgcag	aagcgcggcc	gtctggaccg	6180
atggctgtgt	agaagtactc	gccgatagtg	gaaaccgacg	ccccagcact	cgtccgaggg	6240
caaaggaata	gtgaggtaca	gcttggatcg	atccggctgc	taacaaagcc	cgaaaggaag	6300
ctgagttggc	tgctgccacc	gctgagcaat	aactagcata	acccttggg	gcctctaaac	6360
gggtcttgag	gggttttttg	ctgaaaggag	gaactatata	cggatgatcg	ggcgcgcgct	6420
cgacggatcc	gtacgagatc	cggccggcca	gacctgcag	gagatccaag	cttttgatcc	6480
atgcccttca	tttgccgctt	attaattaat	ttggtaacag	tcgtactaa	tcagttactt	6540
atccttcccc	catcataatt	aatcttggta	gtctcgaatg	ccacaacact	gactagtctc	6600
ttggatcata	agaaaaagcc	aaggaacaaa	agaagacaaa	acacaatgag	agtatccttt	6660
gcatagcaat	gtctaagttc	ataaaattca	aacaaaaacg	caatcacaca	cagtggacat	6720
cacttatcca	ctagctgata	aggatcgccg	cgtcaagaaa	aaaaaactgg	accccaaaag	6780
ccatgcacaa	caacacgtac	tcacaaaggt	gtcaatcgag	cagcccaaaa	cattcaccaa	6840
ctcaacccat	catgagccct	cacatttggt	gtttctaacc	caacctcaaa	ctcgtattct	6900
cttcgccac	ctcatttttg	tttatttcaa	caccctcaa	actgcatgcc	acccctggc	6960
caaagtcca	tgcatgttaa	caagacctat	gactataaat	agctgcaatc	tcggcccagg	7020
ttttcatcat	caagaaccag	ttcaatatcc	tagtacaccg	tattaaagaa	tttaagatat	7080
actgcggccg	caccatggag	gtggtgaatg	aaatagtctc	aattgggcag	gaagttttac	7140
ccaaagttga	ttatgcccaa	ctctggagtg	atgccagtca	ctgtgaggtg	ctttacttgt	7200
ccatcgcat	tgtcatcttg	aagttcactc	ttggccccct	tggtcacaaa	ggtcagtctc	7260
gtatgaagtt	tgttttcacc	aattacaacc	ttctcatgtc	cattttattcg	ttgggatcat	7320
tcctctcaat	ggcatatgcc	atgtacacca	tcggtgttat	gtctgacaac	tgcgagaagg	7380
cttttgacaa	caacgtcttc	aggatcacca	cgcagttggt	ctatttgagc	aagttcctgg	7440
agtatattga	ctccttctat	ttgccactga	tgggcaagcc	tctgacctgg	ttgcaattct	7500
tccatcattt	gggggcaccg	atggatatgt	ggctgttcta	taattaccga	aatgaagctg	7560
tttggaattt	tgtgctgttg	aatggtttca	tccactggat	catgtacggt	tattattgga	7620
ccagattgat	caagctgaag	ttcccatgc	caaaatccct	gattacatca	atgcagatca	7680

ttcaattcaa tgttggtttc tacattgtct ggaagtacag gaacattccc tggtatcgcc 7740
aagatgggat gaggatgttt ggctggttct tcaattactt ttatgttggc acagtcttgt 7800
gtttgttctt gaatttctat gtgcaaacgt atatcgtcag gaagcacaag ggagccaaaa 7860
agattcagtg agc 7873

<210> 45
<211> 5252
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Plasmídeo pKR457

<220>
<221> característica misc
<222> (3872)..(3872)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 45
gtacgtgggc ggatccccg ggctgcagga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 60
actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgccctgc agcacatccc cctttcgcca 120
gctggcgtaa tagcgaagag gcccgacccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga 180
atggcgaaatg gcgcctgatg cggatattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc 240
gcatatgggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac 300
accgcgaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca 360
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga 420
aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctattttt atagggttaat gtcattgataa 480
taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt 540
gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa 600
tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta 660
ttcccttttt tgcggcatth tgccttcctg tttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag 720
taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagggtggtta catcgaactg gatctcaaca 780
gcggtaagat ccttgagagt ttctgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta 840
aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc 900
gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc 960
ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca 1020

ctgcgggccaa	cttactttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	gcttttttgc	1080
acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	atcgttggga	accggagctg	aatgaagcca	1140
taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	ttgcgcaaac	1200
tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	tggatggagg	1260
cggataaagt	tgcaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	tttattgctg	1320
ataaatctgg	agccggtgag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcactg	gggccagatg	1380
gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	atggatgaac	1440
gaaatagaca	gatcgtgtag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	ctgtcagacc	1500
aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	1560
aggtgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	1620
actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	1680
gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaac	caccgctacc	agcggtggtt	tgtttgccgg	1740
atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	1800
atactgtcct	tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	1860
ctacatacct	cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	gataagtcgt	1920
gtcttaccgg	gttggaactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgagcgg	tcgggctgaa	1980
cgggggggtc	gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	ctgagatacc	2040
tacagcgtga	gctatgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	gacaggtatc	2100
cggtaagcgg	cagggctcga	acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	ggaaacgcct	2160
ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcgcc	acctctgact	tgagcgtcga	tttttgtgat	2220
gctcgtcagg	ggggcggagc	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcggccttt	ttacgggttc	2280
tggccttttg	ctggcctttt	gctcacatgt	tctttcctgc	gttatcccct	gattctgtgg	2340
ataaccgtat	taccgccttt	gagtgaactg	ataccgctcg	ccgcagccga	acgaccgagc	2400
gcagcgagtc	agtgaagcga	gaagcggaag	agcgcccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	2460
cgcgttggcc	gattcattaa	tgcagctggc	acgacagggt	tcccgaactg	aaagcgggca	2520
gtgagcgcaa	cgcaattaat	gtgagttagc	tactcatta	ggcaccaccg	gctttacact	2580
ttatgcttcc	ggctcgtatg	ttgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	2640
acagctatga	ccatgattac	gccaaagctt	catgcctgca	ggtcgactcg	acgtacgtcc	2700

tcgaagagaa	gggttaataa	cacatttttt	aacatttttta	acacaaaattt	tagttattta	2760
aaaattttatt	aaaaaattta	aaataagaag	aggaactctt	taaataaatc	taacttacia	2820
aattttatgat	ttttaataag	ttttcaccaa	taaaaaatgt	cataaaaaata	tgttaaaaag	2880
tatattatca	atattctctt	tatgataaat	aaaaagaaaa	aaaaaataaa	agttaagtga	2940
aatgagatt	gaagtgactt	taggtgtgta	taaatatatc	aaccccgcca	acaattttatt	3000
taatccaaat	atattgaagt	atattattcc	atagccttta	tttattttata	tattttattat	3060
ataaaagctt	tatttgttct	aggttgttca	tgaaatattt	ttttggtttt	atctccgttg	3120
taagaaaatc	atgtgctttg	tgctgccact	cactattgca	gctttttcat	gcattggtca	3180
gattgacgg	tgattgtatt	tttgtttttt	atggttttgt	gttatgactt	aagtcttcat	3240
ctctttatct	cttcatcagg	tttgatgggt	acctaatatg	gtccatgggt	acatgcatgg	3300
ttaaattagg	tgccaactt	tggtgtgaac	gatagaattt	tttttatatt	aagtaaacta	3360
tttttatatt	atgaaataat	aataaaaaaa	atattttatc	attattaaca	aatcatatt	3420
agttaatttg	ttaactctat	aataaaagaa	atactgtaac	attcacatta	catggtaaca	3480
tctttccacc	ctttcatttg	ttttttgttt	gatgactttt	tttcttggtt	aaattttatt	3540
cccttctttt	aaatttgga	tacattatca	tcatatataa	actaaaatac	taaaaacagg	3600
attacacaaa	tgataaataa	taacacaaat	atttataaat	ctagctgcaa	tatattttaa	3660
ctagctatat	cgatattgta	aaataaaaact	agctgcattg	atactgataa	aaaaatatca	3720
tgtgctttct	ggactgatga	tgacagtatac	ttttgacatt	gcctttattt	tatttttcag	3780
aaaagctttc	ttagttctgg	gttcttcatt	atttgtttcc	catctccatt	gtgaattgaa	3840
tcatttgctt	cgtgtcacia	atacaattta	gntaggtaca	tgcatgggtc	agattcacgg	3900
tttattatgt	catgacttaa	gttcatggta	gtacattacc	tgccacgcat	gcatttatatt	3960
ggttagattt	gataggcaaa	tttggttggtc	aacaatataa	atataaataa	tgttttttata	4020
ttacgaaata	acagtgatca	aaacaaacag	ttttatcttt	attaacaaga	ttttgttttt	4080
gtttgatgac	gttttttaat	gtttacgctt	tcccccttct	tttgaattta	gaacacttta	4140
tcatcataaa	atcaaatact	aaaaaaatta	catattttcat	aaataataac	acaaatattt	4200
ttaaaaaatc	tgaaataata	atgaacaata	ttacatatta	tcacgaaaat	tcattaataa	4260
aatatttata	taaataaaat	gtaatagtag	ttatatgtag	gaaaaaagta	ctgcacgcat	4320
aatatataca	aaaagattaa	aatgaactat	tataaataat	aacactaaat	taatggtgaa	4380

```

tcatatcaaaa ataatgaaaa agtaaataaa atttgtaatt aacttctata tgtattacac 4440
acacaaaataa taaataatag taaaaaaaat tatgataaat atttaccatc tcataagata 4500
tttaaaataa tgataaaaat atagattatt ttttatgcaa ctagctagcc aaaaagagaa 4560
cacgggtata tataaaaaga gtacctttaa attctactgt acttccttta ttcttgacgt 4620
ttttatatca agtggacata cgtgaagatt ttaattatca gtctaaatat ttcattagca 4680
cttaatactt ttctgtttta ttctatcct ataagtagtc ccgattctcc caacattgct 4740
tattcacaca actaactaag aaagtcttcc atagccccc aagcggccgc gacacaagtg 4800
tgagagtact aaataaatgc tttggttgta cgaaatcatt aactaaata aaataatcaa 4860
agcttatata tgccttccgc taaggccgaa tgcaaagaaa ttggttcttt ctcgttatct 4920
tttgccactt ttactagtag gtattaatta ctacttaatc atctttgttt acgggtcatt 4980
atatccggtc tagaggatcc aaggccgcga agttaaagc aatgttgtca cttgtcgtac 5040
taacacatga tgtgatagtt tatgctagct agctataaca taagctgtct ctgagtgtgt 5100
tgtatattaa taaagatcat cactggtgaa tgggtgatcgt gtacgtaccc tacttagtag 5160
gcaatggaag cacttagagt gtgctttgtg catggccttg cctctgtttt gagacttttg 5220
taatgttttc gagttttaa atcttgcttt gc 5252

```

```

<210> 46
<211> 6526
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo pKR1138

```

```

<220>
<221> característica misc
<222> (4340)..(4340)
<223> n é a, c, g, ou t

```

```

<400> 46
ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aaatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
taaataaaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
ttctttctcg ttatcttttg ccacttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
ttgtttacgg ctcatatat ccggtctaga ggatccaagg ccgcgaagtt aaaagcaatg 240
ttgtcacttg tcgtactaac acatgatgtg atagtttatg ctagctagct ataacataag 300
ctgtctctga gtgtgttgta tattaataaa gatcatcact ggtgaatggg gatcgtgtac 360

```

gtaccctact tagtaggcaa tggaagcact tagagtgtgc tttgtgcatg gccttgccctc	420
tgttttgaga cttttgtaat gttttcgagt ttaaatacttt gcctttgcgt acgtgggcgg	480
atcccccggg ctgcaggaat tcaactggcg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc	540
ctggcggttac ccaacttaat cgccttgag cacaaccccc tttcgccagc tggcgtaata	600
gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggccaatggc	660
gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca	720
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac	780
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga	840
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacccgc atcacgaaa cgcgcgagac	900
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atgggttctt	960
agacgtcagg tggcaactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct	1020
aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat	1080
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg	1140
cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg	1200
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc	1260
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat	1320
gtggcgcggt attatccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact	1380
attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca	1440
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataaact gcggccaact	1500
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg	1560
atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg	1620
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg	1680
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg	1740
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag	1800
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc	1860
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga	1920
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat	1980
atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc	2040

tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	2100
accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	2160
gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtgggtttg	tttgccggat	caagagctac	2220
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgtccttc	2280
tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	2340
ctctgcta	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	2400
tggactcaag	acgatatgta	ccggataagg	cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	2460
gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	2520
tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcggca	2580
gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	2640
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	2700
ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgc	2760
ggccttttgc	tcacatgttc	tttcctgcgt	tatcccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	2820
ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	gaccgagcgc	agcgagtcag	2880
tgagcgagga	agcggaagag	cgcccaatac	gcaaaccgcc	tctccccgcg	cgttggccga	2940
ttcattaatg	cagctggcac	gacaggtttc	ccgactggaa	agcgggcagt	gagcgcaacg	3000
caattaatgt	gagttagctc	actcattagg	caccccaggc	tttacacttt	atgcttcogg	3060
ctcgtatgtt	gtgtggaatt	gtgagcggat	aacaatttca	cacaggaaac	agctatgacc	3120
atgattacgc	caagcttgca	tgcctgcagg	tcgactcgac	gtacgtcctc	gaagagaagg	3180
gttaataaca	cattttttta	cattttttaac	acaaatttta	gttattttaa	aattttattaa	3240
aaaattttaa	ataagaagag	gaactcttta	aataaatcta	acttacaaaa	tttatgat	3300
ttaataagtt	ttcaccaata	aaaaatgtca	taaaaatatg	ttaaaaagta	tattatcaat	3360
attctcttta	tgataaataa	aaagaaaaaa	aaaataaaaag	ttaagtga	atgagattga	3420
agtgacttta	ggtgtgtata	aatatatcaa	ccccgccaac	aattttattta	atccaaatat	3480
attgaagtat	attattccat	agcctttatt	tatttatata	tttattatat	aaaagcttta	3540
tttgttctag	gttggtcatg	aaatatTTTT	ttggttttat	ctccgttgta	agaaaatcat	3600
gtgctttgtg	tcgcactca	ctattgcagc	tttttcatgc	attggtcaga	ttgacggttg	3660
attgtatttt	tgttttttat	ggttttgtgt	tatgacttaa	gtcttcatct	ctttatctct	3720

tcatacaggtt	tgatgggttac	ctaataatggt	ccatgggttac	atgcatggtt	aaattaggtg	3780
gccaactttg	ttgtgaacga	tagaattttt	tttatattaa	gtaaactatt	tttatattat	3840
gaaataataa	taaaaaaaaa	attttatcat	tattaacaaa	atcatattag	ttaatttggt	3900
aactctataa	taaaagaaat	actgtaacat	tcacattaca	tggtaacatc	tttccaccct	3960
ttcatttggt	ttttgtttga	tgactttttt	tcttgtttaa	atttatattc	cttcttttaa	4020
atttgaata	cattatcatc	atatataaac	taaaatacta	aaaacaggat	tacacaaatg	4080
ataaataata	acacaaatat	ttataaatct	agctgcaata	tatttaaact	agctatatcg	4140
atattgtaaa	ataaaactag	ctgcattgat	actgataaaa	aaatatcatg	tgctttctgg	4200
actgatgatg	cagtatactt	ttgacattgc	ctttatttta	tttttcagaa	aagctttctt	4260
agttctgggt	tcttcattat	ttgtttccca	tctccattgt	gaattgaatc	atttgcttcg	4320
tgtcacaaat	acaatttagn	taggtacatg	cattggtcag	attcacgggt	tattatgtca	4380
tgacttaagt	tcatggtagt	acattacctg	ccacgcatgc	attatattgg	ttagatttga	4440
taggcaaatt	tggttgtcaa	caatataaat	ataaataatg	tttttatatt	acgaaataac	4500
agtgatcaaa	acaaacaggt	ttatctttat	taacaagatt	ttgtttttgt	ttgatgacgt	4560
tttttaatgt	ttacgctttc	ccccttcttt	tgaatttaga	acactttatc	atcataaaat	4620
caaatactaa	aaaaattaca	tatttcataa	ataataacac	aaatattttt	aaaaaatctg	4680
aaataataat	gaacaatatt	acatattatc	acgaaaattc	attaataaaa	atattatata	4740
aataaaatgt	aatagtagtt	atatgtagga	aaaaagtact	gcacgcataa	tatatacaaa	4800
aagattaaaa	tgaactatta	taaataataa	cactaaatta	atggtgaatc	atatcaaaat	4860
aatgaaaaag	taaataaaat	ttgtaattaa	cttctatatg	tattacacac	acaaataata	4920
aataatagta	aaaaaaatta	tgataaatat	ttaccatctc	ataagatatt	taaaataatg	4980
ataaaaaatat	agattatttt	ttatgcaact	agctagccaa	aaagagaaca	cgggtatata	5040
taaaaagagt	acctttaaat	tctactgtac	ttcctttatt	cctgacgttt	ttatatcaag	5100
tgacacatcg	tgaagatttt	aattatcagt	ctaaatattt	cattagcact	taatactttt	5160
ctgttttatt	cctatcctat	aagtagtccc	gattctccca	acattgctta	ttcacacaac	5220
taactaagaa	agtcttccat	agccccccaa	gcggccgcac	catggtgaaa	aggccagcac	5280
ttccgctgac	cgttgatggg	gtcacctatg	atgtgtctgc	ctggttgaac	catcatccag	5340
ggggtgctga	catcattgag	aactaccgcg	gtcgtgatgc	cactgatgtc	tttatggtta	5400

```

tgcactctga aaatgctgtg agtaaactaa gaaggatgcc tatcatggaa ccatcatctc 5460
cactgacgcc tacgccaccg aaaccaact cagacgaacc gcaggaggat ttccgcaagc 5520
tccgagatga gctcatcgca gcaggaatgt tcgacgcata accgatgtgg taogcatata 5580
agacgctcag tacgctgggc ctgggggtcc tcgcggtgct attgatgacc cagtggcact 5640
ggtagctcgt cggggcaatc gtggtgggca ttcacttcca acaaatgggt tgggtgtcgc 5700
acgatatctg ccaccatcag ctgttcaagg accgatcgat caacaacgcc atcggttgc 5760
ttttcgggaa cgtcttgcaa gggttctctg tgacctggtg gaaggacagg cacaatgcac 5820
accactccgc caccaacgtg caaggccacg accccgacat tgacaacctg ccgctgctgg 5880
catggtccaa ggaggacgtg gagagggccg gccggttctc acggcggatg atcaagtacc 5940
agcaatacta cttcttcttc atctgtgccc tcctgaggtt catctggtgc ttccagagca 6000
tccacacagc cacgggcctg aaggatcgca gcaaccagta ctaccgcagg cagtacgaga 6060
aagagagcgt gggcctggcc ctccactggg gcctgaaggc gttgttctac tacttttata 6120
tgccaagctt cttgaccgga ctcatggtgt ttttcgtgtc cgagttgctt gggggcttcg 6180
gcatcgccat cgtggtgttc atgaaccact acccctgga gaagatccag gactcggtgt 6240
gggacggcca cggcttttgc gccggccaga ttcacgaaac gatgaacgtc cagcggggac 6300
tcgtcacgga ctggttcttc ggtgggctga attaccaaat cgagcaccac ctgtggccga 6360
cgctgccccg gcacaacctg acggcggcca gcatcaaagt ggagcagttg tgcaagaagc 6420
acaacttgcc gtatcgcagc cccccaatgc tggaggggggt gggcatcctg atcagctacc 6480
tgggcacctt tgcccgcagt gtggcaaagg ccgacaaggc gtaagc 6526

```

<210> 47

<211> 11707

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo pKR1152

<220>

<221> característica misc

<222> (10532)..(10532)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 47

```

gtacgagatc cggccggcca gatcctgcag gagatccaag cttttgatcc atgcccttca 60
tttgccgctt attaattaat ttggtaacag tccgtactaa tcagttactt atccttcccc 120

```

catcataatt aatcttggta gtctcgaatg ccacaacact gactagtctc ttggatcata	180
agaaaaagcc aaggaacaaa agaagacaaa acacaatgag agtatccttt gcatagcaat	240
gtctaagttc ataaaaattca aacaaaaacg caatcacaca cagtggacat cacttatcca	300
ctagctgatc aggatcgccg cgtcaagaaa aaaaaactgg accccaaaag ccatgcacaa	360
caacacgtac tcacaaaggt gtcaatcgag cagcccaaaa cattcaccaa ctcaacccat	420
catgagccct cacatttggt gtttctaacc caacctcaaa ctcgatttct ctccgccac	480
ctcatttttg tttatttcaa caccgctcaa actgcatgcc accccgtggc caaatgtcca	540
tgcatgttaa caagacctat gactataaat agctgcaatc tcggcccagg ttttcatcat	600
caagaaccag ttcaatatcc tagtacaccg tattaagaa ttaagatat actgcgggcg	660
caccatggag gtggtgaatg aaatagtctc aattgggcag gaagttttac ccaaagttga	720
ttatgcccaa ctctggagtg atgccagtc ctgtgagtg ctttacttgt ccatcgcat	780
tgtcatcttg aagttcactc ttggccccct tggccaaaa ggtcagtctc gtatgaagtt	840
tgttttcacc aattacaacc ttctcatgtc catttattcg ttgggatcat tcctctcaat	900
ggcatatgcc atgtacacca tcggtgttat gtctgacaac tgcgagaagg cttttgacaa	960
caacgtcttc aggatcacca cgcagttggt ctatttgagc aagttcctgg agtatattga	1020
ctccttctat ttgccactga tgggcaagcc tctgacctgg ttgcaattct tccatcattt	1080
gggggcaccg atggatatgt ggctgttcta taattaccga aatgaagctg tttggatttt	1140
tgtgctgttg aatggtttca tccactggat catgtacggg tattattgga ccagattgat	1200
caagctgaag ttcccatgc caaaatccct gattacatca atgcagatca ttcaattcaa	1260
tgttggtttc tacattgtct ggaagtacag gaacattccc tgttatcgcc aagatgggat	1320
gaggatgttt ggctggttct tcaattactt ttatgttggc acagtcttgt gtttgttctt	1380
gaatttctat gtgcaaacgt atatcgtcag gaagcacaag ggagccaaaa agattcagtg	1440
agcgcccgca agtatgaact aaaatgcatg taggtgtaag agctcatgga gagcatggaa	1500
tattgtatcc gaccatgtaa cagtataata actgagctcc atctcacttc ttctatgaat	1560
aaacaaagga tgttatgata tattaacact ctatctatgc accttattgt tctatgataa	1620
atttctctt attattataa atcatctgaa tcgtgacggc ttatggaatg cttcaaatag	1680
tacaaaaaca aatgtgtact ataagacttt ctaaacaatt ctaaccttag cattgtgaac	1740
gagacataag tgtaagaag acataacaat tataatggaa gaagtttgc tccatttata	1800

tattatata	taccactta	tgtattatat	taggatgtta	aggagacata	acaattataa	1860
agagagaagt	ttgtatccat	ttatatatta	tatactaccc	atztatatat	tatacttatac	1920
cacttatitta	atgtctttat	aaggtttgat	ccatgatatt	tctaataattt	tagttgatat	1980
gtatatgaaa	gggtactatt	tgaactctct	tactctgtat	aaaggttgga	tcatccttaa	2040
agtgggtcta	tttaatttta	ttgcttctta	cagataaaaa	aaaaattatg	agttggtttg	2100
ataaaatatt	gaaggattta	aaataataat	aaataacata	taatatatgt	atataaattt	2160
attataatat	aacattttatc	tataaaaaag	taaatattgt	cataaatcta	tacaatcggt	2220
tagccttgct	ggacgaatct	caattattta	aacgagagta	aacatatttg	actttttgggt	2280
tatttaacaa	attattattt	aacactatat	gaaatttttt	tttttatcag	caaagaataa	2340
aattaaatta	agaaggacaa	tggtgtccca	atccttatac	aaccaacttc	cacaagaaag	2400
tcaagtcaga	gacaacaaaa	aaacaagcaa	aggaaatttt	ttaatttgag	ttgtcttggt	2460
tgctgcataa	tttatgcagt	aaaacactac	acataaccct	tttagcagta	gagcaatggt	2520
tgaccgtgtg	cttagcttct	tttattttat	ttttttatca	gcaaagaata	aataaaataa	2580
aatgagacac	ttcagggatg	tttcaacaag	cttggcgcgc	cgttctatag	tgtcacctaa	2640
atcgtatgtg	tatgatacat	aaggttatgt	attaattgta	gccgcgttct	aacgacaata	2700
tgtccatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	cgcatagtta	agccagcccc	2760
gacacccgcc	aacacccgct	gacgcgccct	gacgggcttg	tctgctcccg	gcatccgctt	2820
acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	2880
cgaaacgcgc	gagacgaaag	ggcctcgtga	tacgcctatt	tttatagggt	aatgtcatga	2940
ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	3000
aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaac	3060
caccgctacc	agcggtggtt	tgtttgccgg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	3120
taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	atactgtcct	tctagtgtag	ccgtagttag	3180
gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	ctacatacct	cgctctgcta	atcctgttac	3240
cagtggctgc	tgccagtggc	gataagtcgt	gtcttacccg	gttggaactca	agacgatagt	3300
taccggataa	ggcgcagcgg	tcgggctgaa	cgggggggtt	gtgcacacag	cccagcttgg	3360
agcgaacgac	ctacaccgaa	ctgagatacc	tacagcgtga	gcattgagaa	agcgccacgc	3420
ttcccgaagg	gagaaaggcg	gacaggtatc	cggttaagcgg	cagggtcgga	acaggagagc	3480

gcacgagggg	gcttccaggg	ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcgcc	3540
acctctgact	tgagcgtcga	tttttgtgat	gctcgtcagg	ggggcggagc	ctatggaaaa	3600
acgccagcaa	cgcgcccttt	ttacggttcc	tggccttttg	ctggcctttt	gctcacatgt	3660
tctttcctgc	gttatccctt	gattctgtgg	ataaccgtat	taccgccttt	gagtgagctg	3720
ataccgctcg	ccgcagccga	acgaccgagc	gcagcgagtc	agtgagcgag	gaagcggaag	3780
agcgcccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	cgcgttggcc	gattcattaa	tgcaggttga	3840
tcgattcgac	atcgatctag	taacatagat	gacaccgcgc	gcgataatth	atcctagtht	3900
gcgcgctata	ttttgttttc	tatcgcgat	taaatgtata	attgcgggac	tctaatacata	3960
aaaacccatc	tcataaataa	cgatcatgat	tacatgttaa	ttattacatg	cttaacgtaa	4020
ttcaacagaa	attatatgat	aatcatcgca	agaccggcaa	caggattcaa	tcttaagaaa	4080
ctttatttgc	aaatgtttga	acgatctgct	tcgacgcact	ccttcttttag	gtacctcact	4140
attcctttgc	cctcggaaga	gtgctggggc	gtcggtttcc	actatcggcg	agtacttcta	4200
cacagccatc	ggtccagacg	gccgcgcttc	tgcgggcgat	ttgtgtacgc	ccgacagtcc	4260
cggctccgga	tcggacgatt	gcgtcgcatc	gacctgcgc	ccaagctgca	tcacgaaat	4320
tgccgtcaac	caagctctga	tagagttgg	caagaccaat	gcggagcata	tacgcccgga	4380
gccgcggcga	tcctgcaagc	tcgggatgcc	tcgctcgaa	gtagcgcgtc	tgctgtccca	4440
tacaagccaa	ccacggcctc	cagaagaaga	tggtggcgac	ctcgtattgg	gaatccccga	4500
acatcgctc	gctccagtca	atgaccgctg	ttatgcggcc	attgtccgtc	aggacattgt	4560
tggagccgaa	atccgcgtgc	acgaggtgcc	ggacttcggg	gcagtcctcg	gccccaaagca	4620
tcagctcatc	gagagcctgc	gcgacggacg	cactgacggg	gtcgtccatc	acagtttgcc	4680
agtgatacac	atggggatca	gcaatcggc	atatgaaatc	acgccatgta	gtgtattgac	4740
cgattccttg	cggtccgaat	gggccgaacc	cgctcgtctg	gctaagatcg	gccgcagcga	4800
tcgcatccat	ggcctccgcg	accggctgca	gaacagcggg	cagttcgggt	tcaggcagggt	4860
cttgcaacgt	gacaccctgt	gcacggcggg	agatgcaata	ggtcaggctc	tcgctgaatt	4920
ccccaatgtc	aagcacttcc	ggaatcggga	gcgcggccga	tgcaaagtgc	cgataaacat	4980
aacgatcttt	gtagaaacca	tcggcgcagc	tatttaccgc	caggacatat	ccacgccttc	5040
ctacatcgaa	gctgaaagca	cgagattctt	cgccctccga	gagctgcac	aggtcggaga	5100
cgctgtcgaa	cttttcgac	agaaacttct	cgacagacgt	cgcggtgagt	tcaggctttt	5160

tcatggttta	ataagaagag	aaaagagttc	ttttgttatg	gctgaagtaa	tagagaaatg	5220
agctcgagcg	tgtcctctcc	aaatgaaatg	aacttcctta	tatagaggaa	gggtcttgcg	5280
aaggatagtg	ggattgtgcg	tcatccctta	cgtcagtggg	gatgtcacat	caatccactt	5340
gctttgaaga	cgtggttgga	acgtcttctt	tttccacgat	gctcctcgtg	gggtgggggtc	5400
catctttggg	accactgtcg	gcagaggcat	cttgaatgat	agcctttcct	ttatcgcaat	5460
gatggcattt	gtaggagcca	ccttcctttt	ctactgtcct	ttcgatgaag	tgacagatag	5520
ctgggcaatg	gaatccgagg	aggtttcccg	aaattatcct	ttgttgaaaa	gtctcaatag	5580
ccctttgggc	ttctgagact	gtatctttga	cattttttgga	gtagaccaga	gtgtcgtgct	5640
ccaccatgtt	gacgaagatt	ttcttcttgt	cattgagtcg	taaaagactc	tgtatgaact	5700
gttcgccagt	cttcacggcg	agttctgtta	gacctcgtat	ttgaatctta	gactccatgc	5760
atggccttag	attcagtagg	aactaccttt	ttagagactc	caatctctat	tacttgccct	5820
ggtttatgaa	gcaagccttg	aatcgtccat	actggaatag	tacttctgat	cttgagaaat	5880
atgtctttct	ctgtgttctt	gatgcaatta	gtcctgaatc	ttttgactgc	atctttaacc	5940
ttcttgggaa	ggtatttgat	ctcctggaga	ttgttactcg	ggtagatcgt	cttgatgaga	6000
cctgctgcgt	aggcctctct	aaccatctgt	gggtcagcat	tctttctgaa	attgaagagg	6060
ctaaccttct	cattatcagt	ggtgaacata	gtgtcgtcac	cttcaccttc	gaacttcctt	6120
cctagatcgt	aaagatagag	gaaatcgtcc	attgtaatct	ccggggcaaa	ggagatctct	6180
tttggggctg	gatcactgct	gggccttttg	gttcctagcg	tgagccagtg	ggctttttgc	6240
tttgggtggc	ttgttagggc	cttagcaaag	ctcttgggct	tgagttgagc	ttctcctttg	6300
gggatgaagt	tcaacctgtc	tgtttgctga	cttggttgtg	acgcgtcagc	tgctgctctt	6360
gcctctgtaa	tagtggcaaa	tttcttgtgt	gcaactccgg	gaacgcggtt	tgttgccgcc	6420
tttgtacaac	cccagtcac	gtatataccg	gcatgtggac	cgttatacac	aacgtagtag	6480
ttgatatgag	ggtgttgaat	acccgattct	gctctgagag	gagcaactgt	gctgttaagc	6540
tcagattttt	gtgggattgg	aattggatcg	atctcgatcc	cgcgaaatta	atacgactca	6600
ctatagggag	accacaacgg	tttccctcta	gaaataatct	tgtttaactt	taagaaggag	6660
atatacccat	ggaaaagcct	gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	6720
agttcgacag	cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggaggg	cgaagaatct	cgtgctttca	6780
gcttcgatgt	aggagggcgt	ggatatgtcc	tgccgggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	6840

acaaagatcg	ttatgtttat	cggcactttg	catcggccgc	gctcccgatt	ccggaagtgc	6900
ttgacattgg	ggaattcagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgccgt	gcacaggggtg	6960
tcacgttgca	agacctgcct	gaaaccgaac	tgcccgtgt	tctgcagccg	gtcgcggagg	7020
ctatggatgc	gatcgctgcg	gccgatctta	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	7080
cgcaaggaat	cgggtcaatac	actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	7140
atgtgtatca	ctggcaaact	gtgatggacg	acaccgtcag	tgcgtccgtc	gcgcaggctc	7200
tcgatgagct	gatgctttgg	gccgaggact	gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	7260
atttcggctc	caacaatgtc	ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	7320
gcgaggcgat	gttcggggat	tccaataacg	aggtcgccaa	catcttcttc	tggaggccgt	7380
ggttggttg	tatggagcag	cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgacg	7440
gatcgccgcg	gctccgggcg	tatatgctcc	gcattggtct	tgaccaactc	tatcagagct	7500
tggttgacgg	caatttcgat	gatgcagctt	gggcgcaggg	tcgatgcgac	gcaatcgctc	7560
gatccggagc	cgggactgtc	gggcgtacac	aaatcgcccc	cagaagcgcg	gccgtctgga	7620
ccgatggctg	tgtagaagta	ctcgccgata	gtggaaaccg	acgccccagc	actcgctcca	7680
gggcaaagga	atagtgaggt	acagcttgga	tcgatccggc	tgctaacaaa	gcccgaaagg	7740
aagctgagtt	ggctgctgcc	accgctgagc	aataactagc	ataaccctt	ggggcctcta	7800
aacgggtctt	gaggggtttt	ttgctgaaag	gaggaactat	atccggatga	tcgggcgcgc	7860
cgtcgacgga	tccgtacgca	aaggcaaaga	tttaaacctg	aaaacattac	aaaagtctca	7920
aaacagaggc	aaggccatgc	acaaagcaca	ctctaagtgc	ttccattgcc	tactaagtag	7980
ggtacgtaca	cgatcaccat	tcaccagtga	tgatctttat	taatatacaa	cacactcaga	8040
gacagcttat	gttatagcta	gctagcataa	actatcacat	catgtgttag	tacgacaagt	8100
gacaacattg	cttttaactt	cgcggccttg	gatcctctag	accggatata	atgagccgta	8160
aacaaagatg	attaagtagt	aattaatacg	tactagtaaa	agtggcaaaa	gataacgaga	8220
aagaaccaat	ttctttgcat	tcggccttag	cggaaggcat	atataagctt	tgattatttt	8280
atttagtgta	atgatttcgt	acaaccaaag	catttattta	gtactctcac	acttggtgcg	8340
cggccgctta	cgccttgctg	gcctttgcc	ccatgcgggc	aaagggtgcc	aggtagctga	8400
tcaggatgcc	cacccctcc	agcattgggg	ggctgcgata	cggcaagttg	tgcttcttgc	8460
acaactgctc	cactttgatg	ctggccgcgc	tcaggttgtg	ccggggcagc	gtcggccaca	8520

```

ggtggtgctc gatttggttaa ttcagcccac cgaagaacca gtccgtgacg agtccccgct 8580
ggacgttcat cgtttcgtga atctggccgg cgaaaagcc gtggccgtcc cacaccgagt 8640
cctggatctt ctccaggggg tagtggttca tgaacaccac gatggcgatg ccgaagcccc 8700
caagcaactc ggacacgaaa aacaccatga gtccggtcaa gaagcttggc atataaaagt 8760
agtagaacia cgccttcagg cccagtgga gggccaggcc cacgctctct ttctcgtact 8820
gcctgcggta gtactggttg ctgcgacct tcaggcccgt ggctgtgtgg atgctctgga 8880
agcaccagat gaacctcagg agggcacaga tgaagaagaa gtagtattgc tggtaactga 8940
tcatccgccc tgagaacggg ccggccctct ccacgtctc cttggaccat gccagcagcg 9000
gcaggttgtc aatgtcgggg tcgtggcctt gcacgttggg ggcggagtgg tgtgcattgt 9060
gcctgtcctt ccaccaggtc acagagaacc cttgcaagac gttcccgaag agcaagccga 9120
tggcgcttgt gatcgatcgg tccttgaaca gctgatggg gcagatatcg tgcgacaacc 9180
aaccattttg ttggaagtga atgcccacaa cgattgcccc gacgaggtag cagtgccact 9240
gggtcatcaa tagcaccgcg aggacccga ggcccagcgt actgagcgtc ttatatgctg 9300
accacatcgg tgatgcgtcg aacattcctg ctgcgatgag ctcatctcgg agcttgcgga 9360
aatcctcctg cggttcgtct gagttgggtt tcggtggcgt aggcgtcagt ggagatgatg 9420
gttccatgat aggcattcct cttagtttac tcacagcatt ttcagagtgc ataaccataa 9480
agacatcagt ggcatcacga ccgcggtagt tctcaatgat gtcagcaccc cctggatgat 9540
ggttcaacca ggcagacaca tcataggtga caccatcaac ggtcagcgga agtgctggcc 9600
ttttcaccat ggtgcggccg cttggggggc tatggaagac tttcttagtt agttgtgtga 9660
ataagcaatg ttgggagaat cgggactact tataggatag gaataaaaca gaaaagtatt 9720
aagtgctaata gaaatattta gactgataat taaaatcttc acgtatgtcc acttgatata 9780
aaaacgtcag gaataaagga agtacagtag aatttaaagg tactcttttt atataatccc 9840
gtgttctctt tttggctagc tagttgcata aaaaataatc tatattttta tcattatttt 9900
aaatatctta tgagatggta aatatattatc ataatttttt ttactattat ttattatttg 9960
tgtgtgtaat acatatagaa gttaattaca aattttattt actttttcat tattttgata 10020
tgattcacca ttaatttagt gttattattt ataatagttc attttaatct ttttgatat 10080
attatgcgtg cagtactttt ttctacata taactactat tacattttat ttatataata 10140
tttttattaa tgaattttcg tgataatatg taatattgtt cattattatt tcagattttt 10200

```



```

taaaaatatt tgtgttatta tttatgaaat atgtaatfff tttagtatff gattttatga 10260
tgataaagtg ttctaaattc aaaagaaggg ggaaagcgta aacattaaaa aacgtcatca 10320
aacaaaaaca aaatcttggt aataaagata aaactgtttg ttttgatcac tgttatfftcg 10380
taatataaaa acattatffa tatttatatt gttgacaacc aaatttgcct atcaaatacta 10440
accaatataa tgcattgctg gcaggtaatg tactaccatg aacttaagtc atgacataat 10500
aaaccgtgaa tctgaccaat gcatgtacct anctaaattg tatttgtgac acgaagcaaa 10560
tgattcaatt cacaatggag atgggaaaca aataatgaag aaccagaac taagaaagct 10620
tttctgaaaa ataaaataaa ggcaatgtca aaagtatact gcatcatcag tccagaaagc 10680
acatgatatt tttttatcag tatcaatgca gctagttffa ttttacaata tcgatatagc 10740
tagtttaaat atattgcagc tagatttata aatatttgtg ttattatffa tcatttgtgt 10800
aatcctgttt ttagtattff agtttatata tgatgataat gtattccaaa tttaaaagaa 10860
gggaaataaa tttaaacaag aaaaaaagtc atcaaacaaa aaacaaatga aagggtggaa 10920
agatgttacc atgtaatgtg aatgttacag tatttctfff attatagagt taacaaatta 10980
actaatatga ttttgtaat aatgataaaa tttttttfff attattatff cataatataa 11040
aaatagttta cttaatataa aaaaaattct atcgttcaca acaaagttgg ccacctaat 11100
taaccatgca tgtacctatg gaccatatta ggtaaccatc aaacctgatg aagagataaa 11160
gagatgaaga cttaagtcac aacacaaaac cataaaaaac aaaaatacaa tcaaccgtca 11220
atctgaccaa tgcattgaaa agctgcaata gtgagtggcg acacaaagca catgattttc 11280
ttacaacgga gataaaacca aaaaaatatt tcatgaacaa cctagaacaa ataaagctff 11340
tatataataa atatataaat aaataaaggc tatggaataa tatacttcaa tatatttgga 11400
ttaaataaat tgttggcggg gttgatatat ttatacacac cttaaagtcac ttcaatctca 11460
ttttcactta acttttatff ttttttctt tttatttatc ataaagagaa tattgataat 11520
atactttffa acatattfff atgacattff ttattggtga aaacttatta aaaatcataa 11580
atattgtaag ttagatttat ttaaagagtt cctcttctta ttttaaattt tttataaat 11640
ttttaaataa ctaaaatttg tgttaaaaat gttaaaaaat gtgttattaa cccttctctt 11700
cgaggac 11707

```

```

<210> 48
<211> 1260
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

<220>

<223> gene delat 8desaturase de códon otimizado (denominado "EaD8S")

<400> 48

```

atggtcaagc gacccgctct gcctctcacc gtggacggtg tcacctacga cgtttctgcc      60
tggctcaacc accatccccg aggtgccgac attatcgaga actaccgagg tcgggatgct      120
accgacgtct tcatggttat gcactccgag aacgccgtgt ccaaactcag acgaatgccc      180
atcatggaac cttcctctcc cctgactcca acacctccca agccaaactc cgacgaacct      240
caggaggatt tccgaaagct gcgagacgag ctcatgtctg caggcatggt cgatgcctct      300
cccatgtggt acgcttacia gaccctgtcg actctcggac tgggtgtcct tgccgtgctg      360
ttgatgacct agtggcactg gtacctgggt ggtgctatcg tcctcggcac tcactttcaa      420
cagatgggat ggctctcgca cgacatttgc catcaccagc tgttcaagga ccgatccatc      480
aacaatgcca ttggcctgct cttcggaac gtgcttcagg gcttttctgt cacttggtgg      540
aaggaccgac acaacgctca tcactccgcc accaacgtgc agggtcacga tcccgacatc      600
gacaacctgc ctctcctggc gtggtccaag gaggacgtcg agcgagctgg cccgttttct      660
cgacggatga tcaagtacca acagtattac ttctttttca tctgtgccct tctgcgattc      720
atctggtgct ttcagtcacat tcatactgcc acgggtctca aggatcgaag caatcagtac      780
tatcgaagac agtacgagaa ggagtccgtc ggtctggcac tccactgggg tctcaaggcc      840
ttgttctact atttctacat gccctcgttt ctcaccggac tcatggtggt ctttgtctcc      900
gagctgcttg gtggcttcgg aattgccatc gttgtcttca tgaaccacta ccctctggag      960
aagattcagg actccgtgtg ggatgggtcat ggcttctgtg ctggacagat tcacgagacc     1020
atgaacgttc agcgaggcct cgtcacagac tggtttttcg gtggcctcaa ctaccagatc     1080
gaacatcacc tgtggcctac tcttcccaga cacaacctca ccgctgcctc catcaaagtg     1140
gagcagctgt gcaagaagca caacctgccc taccgatctc ctcccatgct cgaagggtgc     1200
ggcattctta tctcctacct gggcaccttc gctcgaatgg ttgccaagga agacaaggcc     1260

```

<210> 49

<211> 3983

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de DNA do plasmídeo pEaD8S

<400> 49

tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cgagctcggt	acctcgcgaa	420
tgcatctaga	tccatgggtca	agcgacccgc	tctgcctctc	accgtggacg	gtgtcaccta	480
cgacgtttct	gcctggctca	accaccatcc	cggaggtgcc	gacattatcg	agaactaccg	540
aggtcgggat	gctaccgacg	tcttcatggt	tatgcactcc	gagaacgccg	tgtccaaact	600
cagacgaatg	cccatcatgg	aaccttcttc	tcccctgact	ccaacacctc	ccaagccaaa	660
ctccgacgaa	cctcaggagg	atttccgaaa	gctgcgagac	gagctcattg	ctgcaggcat	720
gttcgatgcc	tctcccatgt	ggtacgctta	caagaccctg	tcgactctcg	gactgggtgt	780
ccttgccgtg	ctgttgatga	cccagtggca	ctggtacctg	gttggtgcta	tcgtcctcgg	840
cattcacttt	caacagatgg	gatggctctc	gcacgacatt	tgccatcacc	agctgttcaa	900
ggaccgatcc	atcaacaatg	ccattggcct	gctcttcgga	aacgtgcttc	agggcttttc	960
tgtcacttgg	tggaaggacc	gacacaacgc	tcatcactcc	gccaccaacg	tgcagggtca	1020
cgatcccagc	atcgacaacc	tgctctctct	ggcgtgggtc	aaggaggacg	tcgagcgagc	1080
tggcccgttt	tctcgacgga	tgatcaagta	ccaacagtat	tacttctttt	tcattctgtgc	1140
ccttctgcga	ttcatctggt	gctttcagtc	cattcatact	gccacgggtc	tcaaggatcg	1200
aagcaatcag	tactatcgaa	gacagtaoga	gaaggagtcc	gtcgggtctgg	cactccactg	1260
gggtctcaag	gccttgttct	actattttcta	catgccctcg	tttctcaccg	gactcatggt	1320
gttctttgtc	tccgagctgc	ttggtggctt	cgggaattgcc	atcgttgtct	tcattgaacca	1380
ctaccctctg	gagaagattc	aggactccgt	gtgggatggt	catggcttct	gtgctggaca	1440
gattcacgag	accatgaacg	ttcagcgagg	cctcgtcaca	gactggtttt	tcgggtggcct	1500
caactaccag	atcgaaacatc	acctgtggcc	tactcttccc	agacacaacc	tcaccgctgc	1560
ctccatcaaa	gtggagcagc	tgtgcaagaa	gcacaacctg	ccctaccgat	ctcctcccat	1620
gctcgaaggt	gtcggcattc	ttatctccta	cctgggcacc	ttcgctcgaa	tggttgccaa	1680

ggcagacaag	gcctaagcgg	ccgcatcgga	tcccggggccc	gtcgactgca	gaggcctgca	1740
tgcaagcttg	gcgtaatcat	ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattgtt	atccgctcac	1800
aattccacac	aacatacgag	ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	1860
gagctaactc	acattaattg	cggtgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	1920
gtgccagctg	cattaatgaa	tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattgggag	1980
ctcttcgct	tcctcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggg	2040
atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	2100
gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cggtgctggc	2160
gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtcagag	2220
gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	2280
gcgctctcct	gttccgaccc	tgcgcgttac	cggatacctg	tccgcctttc	tccttcgggg	2340
aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcgttcg	2400
ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	2460
taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	2520
tggttaacagg	attagcagag	cgaggatatgt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	2580
gcctaactac	ggctacacta	gaagaacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	2640
taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	2700
tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	2760
tttgatcttt	tctacggggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	2820
ggtcagtaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	2880
taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	2940
tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcaccc	atagttgcct	gactccccgt	3000
cgtgtagata	actacgatac	gggaggggct	accatctggc	cccagtgcgt	caatgatacc	3060
gcgagacca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	3120
cgagcgcaga	agtggctcctg	caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	attggtgccg	3180
ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgctac	3240
aggcatcggt	gtgtcacgct	cgctgtttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	3300
atcaaggcga	gttacatgat	ccccatggt	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtcc	3360

```

tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcattggta tggcagcact 3420
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 3480
aaccaagtca ttctgagaat agtgatgacg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgatcaat 3540
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcattcattg gaaaacgttc 3600
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 3660
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 3720
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact 3780
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 3840
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 3900
aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag 3960
gcgtatcacg aggccctttc gtc 3983

```

```

<210> 50
<211> 3668
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> pLF121-1

```

```

<220>
<221> característica misc
<222> (3616)..(3655)
<223> n é a, c, g, ou t

```

```

<400> 50
gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg aacagggtcac 60
tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat atccccata gtgagtcgta 120
ttacatggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccggt tctcaaaatc tctgatgtta 180
cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa 240
ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa 300
tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcgggtctgc 360
gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt 420
atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg 480
catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc 540
atcaaccaa ccgttattca ttctgtgattg cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgtc 600

```

gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc	660
atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc	720
ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt	780
cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt	840
ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatacaa	900
tcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc attatcgca gccatttat acccatataa	960
atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg	1020
gctcatagat cttttctcca tcaactgatag ggagtggtaa aataactcca tcaatgatag	1080
agtgtcaaca acatgaccaa aatcccttaa cgtgagttac gcgtattaat tgcgttgccg	1140
tcaactgccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcgcccaa	1200
cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg	1260
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	1320
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	1380
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac	1440
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	1500
taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt	1560
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc	1620
tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc	1680
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	1740
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat	1800
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggttacac tagaagaaca	1860
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt tggtagctct	1920
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt	1980
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct	2040
cagggaaacga cgcgtaccgc tagccaggaa gagttttag aaacgcaaaa aggccatccg	2100
tcaggatggc cttctgctta gtttgatgcc tggcagttta tggcgggct cctgcccgcc	2160
accctccggg ccgttgcttc acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca	2220
ggagagcggt caccgacaaa caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct	2280

```

ttcgttttat ttgatgcctg gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt 2340
tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtcttaagc tcgggccccca aataatgatt 2400
ttattttgac tgatagtac ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg cttttttata 2460
atgccaaactt tgtacaaaaa agttggtttt tttcgggtcta aaatggaagc agccaaagaa 2520
ttggttttcca tcgtccaaga ggagctcccc aaggtggact atgccagct ttggcaggat 2580
gccagcagct gtgaggctct ttacctctcg gtggcattcg tggcgatcaa gttcatgctg 2640
cgccactgg acctgaagcg ccaggccacc ttgaagaagc tggtcacagc atacaacttc 2700
ctcatgtcga tctattcctt tggctccttc ctggccatgg cctatgccct atcagtaact 2760
ggcctcctct ccggcgactg tgagacggcg ttcaacaacg atgtgttcag gatcacaact 2820
cagctgttct acctcagcaa gttcgtagag tacatcgact ccttctacct tccccttatg 2880
gacaagccac tgcgttcctt tcagttcttc catcatttgg gggcccccat tgacatgtgg 2940
ctattctaca aataccgcaa cgaaggagtc tggatctttg tcctgttgaa tgggttcatt 3000
cactggatca tgtacggtta ctattggaag cggtcatca agctgaactt ccccatgccc 3060
aagaacctga tcacctccat gcagatcatc cagttcaatg tcgggttcta catcgtctgg 3120
aagtaccgca atgtgccatg ctaccgccag gatgggatgc gcatgtttgc ctggatcttc 3180
aactactggg atgtcgggac ggtcttgctg ctgttcctca acttttacgt gcagacgtac 3240
atccggaagc cgaggaagaa ccgaggggaag aaggagtagg ccacatggcg cctgcgctgg 3300
aggaaacggg acgctcggat ggtgcactgc acttgactc cgccgtttct agcctccct 3360
cgctctaacc actgcggcat gcctgcttga ggcgtgacgt tgcctcgtat gatacagttt 3420
acacccttcc cacagcccac ggagctgggtg actgtttcca gcgtctgcag atcattgac 3480
tgggtgcaatg tgcacagacc aagccccctt aacgtcttgc ggtgtaccgc tcgacactca 3540
ctgcaagaga cagatggctg agcatgttat agccccttac attctaccct tcgtcccaac 3600
ctgaccgtca cattcnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnaccca 3660
actttctt

```

```

<210> 51
<211> 3684
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> pLF121-2

```

<220>

<221> característica misc

<222> (3632)..(3671)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 51

```

gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg aacagggtcac      60
tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat atcccctata gtgagtcgta      120
ttacatgggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccggtg tctcaaaatc tctgatgtta      180
cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa      240
ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa      300
tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcgggtctgc      360
gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtaa aaataagggt      420
atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg      480
catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc      540
atcaaccaa cgtttattca ttcgtgattg cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgt      600
gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgaggaaca ctgccagcgc      660
atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc      720
ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat gcttgatggt      780
cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt      840
ggcaacgcta cttttgcat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatataa      900
tcgatagatt gtgcacactg attgcccagc attatcgca gccatttat acccatataa      960
atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg     1020
gctcatagat cttttctcca tcaactgatg ggagtggtaa aataactcca tcaatgatag     1080
agtgtcaaca acatgaccaa aatcccttaa cgtgagttac gcgtattaat tgcgttgcgc     1140
tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa     1200
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg     1260
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg     1320
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag     1380
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcggttctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac     1440
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga     1500

```


taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	1560
accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	atgctcacgc	1620
tgtaggatc	tcagttcgg	gtaggtcgtt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	1680
cccgttcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caacccggt	1740
agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggtat	1800
gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggttacac	tagaagaaca	1860
gtatttggt	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	1920
tgatccggca	aacaaccac	cgctggtagc	ggtgggtttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	1980
acgcgagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	2040
cagggaacga	cgcgtaccgc	tagccaggaa	gagttttag	aaacgcaaaa	aggccatccg	2100
tcaggatggc	cttctgctta	gtttgatgcc	tggcagttta	tggcgggct	cctgcccgc	2160
accctccggg	cggttgcttc	acaacgttca	aatccgctcc	cggcggattt	gtcctactca	2220
ggagagcgtt	caccgacaaa	caacagataa	aacgaaaggc	ccagtcttcc	gactgagcct	2280
ttcgttttat	ttgatgcctg	gcagttccct	actctcgcgt	taacgctagc	atggatgttt	2340
tcccagtcac	gacgttgtaa	aacgacggcc	agtcttaagc	tcgggcccc	aataatgatt	2400
ttattttgac	tgatagtgc	ctgttcgttg	caacaaattg	atgagcaatg	cttttttata	2460
atgccaaactt	tgtacaaaaa	agttggattt	tttttcggtc	taaaatggaa	gcagccaaag	2520
aattggtttc	catcgtccaa	gaggagctcc	ccaaggtgga	ctatgccag	ctttggcagg	2580
acgccagcag	ctgtgaggtc	ctttacctct	cgggtggcatt	cgtggcgatc	aagttcatgc	2640
tgcgcccact	ggacctgaag	cgccaggcca	ccttgaagaa	gctgttcaca	gcatacaact	2700
tcctcatgtc	gatctattcc	tttggctcct	tcctggccat	ggcctatgcc	ctatcagtaa	2760
ctggcatcct	ctccggcgac	tgtgagacag	cgttcaacaa	cgatgtgttc	aggatcacao	2820
ctcagctgtt	ctacctcagc	aagttcgtag	agtacatcga	ctccttctac	cttcccccta	2880
tggacaagcc	actgtcgttc	cttcagttct	tccatcattt	gggggctccc	attgacatgt	2940
ggctatttcta	caaataccgc	aacgaaggag	tctggatctt	tgtcctgttg	aatgggttca	3000
ttcactggat	catgtacggt	tactactgga	cgcggctcat	caagctgaac	ttccccatgc	3060
ccaagaacct	gatcacctcc	atgcagatca	tccagttcaa	tgtcgggttc	tacatcgtct	3120
ggaagtaccg	caatgtgcc	tgtaccgcc	aggatgggat	gcgcatgttt	gcctggatct	3180

```

tcaactactg gtacgtcggg acggtcttgc tgctgttcct caacttttac gtgcagacgt 3240
acatccggaa gccgaggaag aaccaaggga agaaggagta ggccacatgg cgcctgcgct 3300
ggaggaacg gtacgtcgg atggtgcaact gcacttgac tccgccgctt ctagcctccc 3360
ctcgtcttaa cctctgcgac atgcctgctt gaggcgtgac gttgcctcgt gcgatacagt 3420
ttacaccctt cccatggccc acggagcagg tgactgtctc cagcgtctgc aattctgatc 3480
attggtctgg tgcaatgtgc gcagaccaag cccctctaac gtcttgcggt gtaccgctcg 3540
aactcactg cacgagacag atggtgagc atgttatagc cctgacatt ctacccttcg 3600
tccttacctg accgtcacat tcatgcttac cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 3660
nnnnnnnnn nacccaactt tctt 3684

```

<210> 52

<211> 774

<212> DNA

<213> Euglena anabaena

<220>

<221> característica misc

<223> EaD9E1o1 CDS

<400> 52

```

atggaagcag ccaaagaatt gggtttccatc gtccaagagg agtccccaa ggtggactat 60
gccagcttt ggagcatgc cagcagctgt gaggtccttt acctctcggg ggcattcgtg 120
gcgatcaagt tcatgctgcg cccactggac ctgaagcgcc aggccacctt gaagaagctg 180
ttcacagcat acaacttcct catgtogac tattcctttg gtccttcct ggccatggcc 240
tatgccctat cagtaactgg catcctctcc ggcgactgtg agacggcggt caacaacgat 300
gtgttcagga tcacaactca gctgtttctac ctgagcaagt tcgtagagta catcgactcc 360
ttctaccttc cccttatgga caagccactg tcgttccttc agttcttcca tcatttgggg 420
gccccattg acatgtggct attctacaaa taccgcaacg aaggagtctg gatctttgtc 480
ctgttgaatg ggttcattca ctggatcatg tacggttact attggacgcg gtcacatcaag 540
ctgaacttcc ccatgcccaa gaacctgac acctccatgc agatcatcca gttcaatgtc 600
gggttctaca tcgtctggaa gtaccgcaat gtgccatgct accgccagga tgggatgcgc 660
atgtttgcct ggatcttcaa ctactggtat gtcgggacgg tcttgctgct gttcctcaac 720
ttttacgtgc agacgtacat ccggaagccg aggaagaacc gagggaagaa ggag 774

```

<210> 53

<211> 774

<212> DNA
 <213> Euglena anabaena

<220>
 <221> característica misc
 <223> EaD9Elo2 CDS

<400> 53
 atggaagcag ccaaagaatt ggtttccatc gtccaagagg agtccccaa ggtggactat 60
 gccagcttt ggcaggacgc cagcagctgt gaggtccttt acctctcggg ggcattcgtg 120
 gcgatcaagt tcatgctgcg cccactggac ctgaagcgcc aggccacctt gaagaagctg 180
 ttcacagcat acaacttcct catgtcgatc ttttcctttg gtccttcctt ggccatggcc 240
 tatgccctat cagtaactgg catcctctcc ggcgactgtg agacagcgtt caacaacgat 300
 gtgttcagga tcacaactca gctgttctac ctgagcaagt tcgtagagta catcgactcc 360
 ttctaccttc cccttatgga caagccactg tcgttccttc agttcttcca tcatttgggg 420
 gctcccattg acatgtggct attctacaaa taccgcaacg aaggagtctg gatctttgtc 480
 ctgttgaatg ggttcattca ctggatcatg tacggttact actggacgcg gtcacatcaag 540
 ctgaacttcc ccatgccccaa gaacctgatc acctccatgc agatcatcca gttcaatgtc 600
 gggttctaca tcgtctggaa gtaccgcaat gtgcatgct accgccagga tgggatgcgc 660
 atgtttgcct ggatcttcaa ctactggtac gtcgggacgg tcttgctgct gttcctcaac 720
 ttttacgtgc agacgtacat ccggaagccg aggaagaacc aagggaagaa ggag 774

<210> 54
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Euglena anabaena

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISC
 <223> Sequência de aminoácidos de EaD9Elo1

<400> 54

Met	Glu	Ala	Ala	Lys	Glu	Leu	Val	Ser	Ile	Val	Gln	Glu	Glu	Leu	Pro
1				5					10					15	
Lys	Val	Asp	Tyr	Ala	Gln	Leu	Trp	Gln	Asp	Ala	Ser	Ser	Cys	Glu	Val
			20					25					30		
Leu	Tyr	Leu	Ser	Val	Ala	Phe	Val	Ala	Ile	Lys	Phe	Met	Leu	Arg	Pro
			35				40					45			
Leu	Asp	Leu	Lys	Arg	Gln	Ala	Thr	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Thr	Ala	Tyr
	50					55					60				

Asn Phe Leu Met Ser Ile Tyr Ser Phe Gly Ser Phe Leu Ala Met Ala
 65 70 75 80
 Tyr Ala Leu Ser Val Thr Gly Ile Leu Ser Gly Asp Cys Glu Thr Ala
 85 90 95
 Phe Asn Asn Asp Val Phe Arg Ile Thr Thr Gln Leu Phe Tyr Leu Ser
 100 105 110
 Lys Phe Val Glu Tyr Ile Asp Ser Phe Tyr Leu Pro Leu Met Asp Lys
 115 120 125
 Pro Leu Ser Phe Leu Gln Phe Phe His His Leu Gly Ala Pro Ile Asp
 130 135 140
 Met Trp Leu Phe Tyr Lys Tyr Arg Asn Glu Gly Val Trp Ile Phe Val
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Gly Phe Ile His Trp Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Trp Thr
 165 170 175
 Arg Leu Ile Lys Leu Asn Phe Pro Met Pro Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 180 185 190
 Met Gln Ile Ile Gln Phe Asn Val Gly Phe Tyr Ile Val Trp Lys Tyr
 195 200 205
 Arg Asn Val Pro Cys Tyr Arg Gln Asp Gly Met Arg Met Phe Ala Trp
 210 215 220
 Ile Phe Asn Tyr Trp Tyr Val Gly Thr Val Leu Leu Leu Phe Leu Asn
 225 230 235 240
 Phe Tyr Val Gln Thr Tyr Ile Arg Lys Pro Arg Lys Asn Arg Gly Lys
 245 250 255

Lys Glu

<210> 55

<211> 258

<212> PRT

<213> Euglena anabaena

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC

<223> Sequência de aminoácidos de EaD9E1o2

<400> 55

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

Lys Val Asp Tyr Ala Gln Leu Trp Gln Asp Ala Ser Ser Cys Glu Val
 20 25 30

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

<210> 56
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo oEAd9ell-1

 <400> 56
 agcggccgca ccatggaagc agccaaagaa ttg

<210> 57
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotídeo oEAd9e11-2

<400> 57
 tgcggccgct actccttctt ccctcg 26

<210> 58
 <211> 4310
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> pKR1137

<400> 58
 aattccagca cactggcggc cggtactagt ggatccgagc tcggtaccaa gcttgatgca 60
 tagcttgagt attctaacgc gtcacctaaa tagcttggcg taatcatggt catagctgtt 120
 tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 180
 gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact 240
 gcccgccttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 300
 ggggagagggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 360
 ctcggtcggtt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca aaggcggtaa tacgggttatc 420
 cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaagcccag 480
 gaaccgtaaa aaggccgcgt tgcgtggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 540
 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 600
 ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg 660
 atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag 720
 gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 780
 tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca 840
 cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 900
 cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt 960
 tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc 1020
 cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtag tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg 1080

cagaaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	acgctcagtg	1140
gaacgaaaac	tcacgttaag	ggatttttgt	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	1200
gatcctttta	aattaaat	gaagttttag	cacgtgtcag	tcctgctcct	cggccacgaa	1260
gtgcacgcag	ttgccggccg	ggtcgcgcag	ggcgaactcc	cgccccacg	gctgctcgcc	1320
gatctcggtc	atggccggcc	cggaggcgtc	cgggaagttc	gtggacacga	cctccgacca	1380
ctcggcgtag	agctcgtcca	ggccgcgcac	ccacaccag	gccagggtgt	tgtccggcac	1440
cacctggtcc	tggaccgcgc	tgatgaacag	ggtcacgtcg	tcccggacca	caccggcgaa	1500
gtcgtcctcc	acgaagtcct	gggagaacct	gagccggctg	gtccagaact	cgaccgctcc	1560
ggcgacgtcg	cgcgcggtga	gcaccggaac	ggcactggtc	aacttgcca	tggtagccct	1620
cctcacgtgc	tattattgaa	gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	1680
tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	1740
acctgtatgc	gggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtgaagga	gaaaataaccg	catcaggaaa	1800
ttgtaagcgt	taataattca	gaagaactcg	tcaagaaggc	gatagaaggc	gatgcgctgc	1860
gaatcgggag	cggcgatacc	gtaaagcacg	aggaagcggg	cagccattc	gccgccaagc	1920
tcttcagcaa	tatcacgggt	agccaacgct	atgtcctgat	agcgggtccg	cacaccacgc	1980
cggccacagt	cgatgaatcc	agaaaagcgg	ccattttcca	ccatgatatt	cggcaagcag	2040
gcatcgccat	gggtcacgac	gagatcctcg	ccgtcgggca	tgctcgctct	gagcctggcg	2100
aacagttcgg	ctggcgcgag	cccctgatgc	tcttcgtcca	gatcatcctg	atcgacaaga	2160
ccggcttcca	tccgagtacg	tgctcgctcg	atgcgatgtt	tcgcttggtg	gtcgaatggg	2220
caggtagccg	gatcaagcgt	atgcagccgc	cgcattgcat	cagccatgat	ggatactttc	2280
tcggcaggag	caaggtgaga	tgacaggaga	tcctgccccg	gcacttcgcc	caatagcagc	2340
cagtccttcc	ccgcttcagt	gacaacgtcg	agcacagctg	cgcaagggaac	gcccgtcgtg	2400
gccagccacg	atagccgcgc	tgctcgtctt	tgcaattcat	tcagggcacc	ggacaggctc	2460
gtcttgacaa	aaagaaccgg	gcgcccctgc	gctgacagcc	ggaacacggc	ggcatcagag	2520
cagccgattg	tctgttgtgc	ccagtcatag	ccgaatagcc	tctccacca	agcggccgga	2580
gaacctgcgt	gcaatccatc	ttgttcaatc	atgcgaaacg	atcctcatcc	tgtctcttga	2640
tcagagcttg	atcccctgcg	ccatcagatc	cttggcgggc	agaaagccat	ccagtttact	2700
ttgcagggct	tcccaacctt	accagagggc	gccccagctg	gcaattccgg	ttcgcttgct	2760

```

gtccataaaa cgcgccagtc tagctatcgc catgtaagcc cactgcaagc tacctgcttt 2820
ctctttggcg ttgcgttttc ccttgtccag atagcccagt agctgacatt catccggggt 2880
cagcaccgtt tctgcggact ggctttctac gtgaaaagga tctaggtgaa gatccttttt 2940
gataatctca tgctgacat ttatatccc cagaacatca ggtaaatggc gtttttgatg 3000
tcattttcgc ggtggctgag atcagccact tcttccccga taacggagac cggcacactg 3060
gccatatcgg tggatcatcat gcgccagctt tcatccccga tatgcaccac cgggtaaagt 3120
tcacgggaga ctttatctga cagcagacgt gcaactggca gggggatcac catcgtcgc 3180
cccggcgtgt caataatatc actctgtaca tccacaaaca gacgataacg gctctctctt 3240
ttataggtgt aaaccttaaa ctgcggtacg tataggctgc gcaactgttg ggaagggcga 3300
tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 3360
ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtga 3420
ttgtaatacg actcactata gggcgaattg ggccctctag atgcatgctc gagcgccgc 3480
cagtgtgatg gatatctgca gaattcagga gcggccgcac catggaagca gccaaagaat 3540
tggtttccat cgtccaagag gagctcccca aggtggacta tgcccagctt tggcaggatg 3600
ccagcagctg tgaggtcctt tacctctcgg tggcattcgt ggcgatcaag ttcattgctc 3660
gccactgga cctgaagcgc caggccacct tgaagaagct gttcacagca tacaacttc 3720
tcatgtcgat ctattccttt ggctccttcc tggccatggc ctatgcccta tcagtaactg 3780
gcatcctctc cggcgactgt gagacggcgt tcaacaacga tgtgttcagg atcacaactc 3840
agctgttcta cctcagcaag ttcgtagagt acatcgactc cttctacctt ccccttatgg 3900
acaagccact gtcgttcctt cagttcttcc atcatttggg ggccccatt gacatgtggc 3960
tattctacaa ataccgcaac gaaggagtct ggatctttgt cctgttgaat gggttcattc 4020
actggatcat gtacggttac tattggacgc ggctcatcaa gctgaacttc cccatgccca 4080
agaacctgat cacctccatg cagatcatcc agttcaatgt cgggttctac atcgtctgga 4140
agtaccgcaa tgtgccatgc taccgccagg atgggatgcg catgtttgcc tggatcttca 4200
actactggtg tgtcgggacg gtcttgcctg tgttctcaa cttttacgtg cagacgtaca 4260
tccggaagcc gaggaagaac cgagggaaga aggagtagcg gccgcacctg 4310

```

<210> 59

<211> 7872

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> pKR1140

<400> 59

ggccgcaagt atgaactaaa atgcatgtag gtgtaagagc tcatggagag catggaatat	60
tgtatccgac catgtaacag tataataact gagctccatc tcacttcttc tatgaataaa	120
caaaggatgt tatgatatat taacactcta tctatgcacc ttattgttct atgataaatt	180
tcctcttatt attataaata atctgaatcg tgacggctta tggaaatgctt caaatagtag	240
aaaaacaaat gtgtactata agactttcta aacaattcta accttagcat tgtgaacgag	300
acataagtgt taagaagaca taacaattat aatggaagaa gtttgtctcc atttatatat	360
tatatattac ccacttatgt attatattag gatgttaagg agacataaca attataaaga	420
gagaagtttg tatccattta tatattatat actaccatt tatatattat acttatccac	480
ttatttaatg tctttataag gtttgatcca tgatatttct aatatttttag ttgatatgta	540
tatgaaaggg tactatttga actctcttac tctgtataaa gggtggatca tccttaaagt	600
gggtctattt aattttattg cttcttacag ataaaaaaaa aattatgagt tggtttgata	660
aaatattgaa ggatttaaaa taataataaa taacatataa tatatgtata taaatttatt	720
ataatataac atttatctat aaaaaagtaa atattgtcat aaatctatac aatcgtttag	780
ccttgctgga cgaatctcaa ttatttaaac gagagtaaac atatttgact ttttggttat	840
ttaacaaatt attatttaac actatatgaa attttttttt ttatcagcaa agaataaaat	900
taaattaaga aggacaatgg tgtcccaatc cttatacaac caacttcac aagaaagtca	960
agtcagagac aacaaaaaaaa caagcaaagg aaatttttta atttgagttg tcttgtttgc	1020
tgcataatth atgcagtaaa aactacaca taaccctttt agcagtagag caatggttga	1080
ccgtgtgctt agcttctttt attttatttt tttatcagca aagaataaat aaaataaaat	1140
gagacacttc agggatgttt caacaagctt ggcgccgctt tctatagtgt cacctaaatc	1200
gtatgtgtat gatacataag gttatgtatt aattgtagcc gcgttctaac gacaatatgt	1260
ccataggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac	1320
acccgccaac acccgtgac gcgccctgac gggcttgtct gctccggca tccgcttaca	1380
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga	1440
aacgcgcgag acgaaagggc ctctgtatgc gcctattttt ataggttaat gtcatgacca	1500
aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag	1560

gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac	1620
cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa	1680
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc	1740
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag	1800
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac	1860
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagac	1920
gaacgacctt caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc	1980
ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca	2040
cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgccacc	2100
tctgacttga gcgtcgatct ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg	2160
ccagcaacgc ggctttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct	2220
ttcctgcgtt atccccgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata	2280
ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc	2340
gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc aggttgatcg	2400
attcgacatc gatctagtaa catagatgac accgcgcgcg ataatttatc ctagtttgcg	2460
cgctatatct tgttttctat cgcgtattaa atgtataatt gcgggactct aatcataaaa	2520
acccatctca taaataacgt catgcattac atgttaatta ttacatgctt aacgtaattc	2580
aacagaaatt atatgataat catcgcaaga ccggcaacag gattcaatct taagaaactt	2640
tattgcaaaa tgtttgaacg atctgcttcg acgcactcct tcttttaggta cctcactatt	2700
cctttgccct cggacgagtg ctggggcgct ggtttccact atcggcgagt acttctacac	2760
agccatcgtt ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg tgtacgcccg acagtcccg	2820
ctccgatcgc gacgattgcg tcgcatcgac cctgcgcca agctgcatca tcgaaattgc	2880
cgtcaaccaa gctctgatag agttggtcaa gaccaatgcg gagcatatac gcccgagacc	2940
gcggcgatcc tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta gcgcgtctgc tgctccatac	3000
aagccaacca cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc gtattgggaa tccccgaaca	3060
tcgcctcgct ccagtcaatg accgctgtta tgcggccatt gtccgtcagg acattgttgg	3120
agccgaaatc cgcgtgcacg aggtgccgga cttcggggca gtcctcggcc caaagcatca	3180
gctcatcgag agcctgcgcg acggacgcac tgacggtgtc gtccatcaca gtttgccagt	3240

gatacacatg gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg ccatgtagtg tattgaccga	3300
ttccttgcgg tccgaatggg ccgaaccgcg tcgtctggct aagatcggcc gcagcgatcg	3360
catccatggc ctccgcgacc ggctgcagaa cagcgggcag ttcggtttca ggcaggtcct	3420
gcaacgtgac accctgtgca cggcgggaga tgcaataggt caggctctcg ctgaattccc	3480
caatgtcaag cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc aaagtgccga taaacataac	3540
gatctttgta gaaaccatcg gcgcagctat ttaccgcgag gacatatcca cgccctccta	3600
catcgaagct gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag ctgcatcagg tcggagacgc	3660
tgtcgaactt ttcgatcaga aacttctcga cagacgtcgc ggtgagttca ggctttttca	3720
tggtttaata agaagagaaa agagtctctt tggtatggct gaagtaatag agaaatgagc	3780
tcgagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac ttccttatat agaggaaggg tcttgccaag	3840
gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct	3900
ttgaagacgt ggttggaaacg tcttcttttt ccacgatgct cctcgtgggt ggggggccat	3960
ctttgggacc actgtcggca gaggcacctt gaatgatagc ctttccttta tcgcaatgat	4020
ggcatttgta ggagccacct tcccttttcta ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg	4080
ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc	4140
tttggctctc tgagactgta tctttgacat ttttgagta gaccagagtg tcgtgctcca	4200
ccatgttgac gaagattttc ttcttgtcat tgagtcgtaa aagactctgt atgaactgtt	4260
cgccagtctt cacggcgagt tctgttagat cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg	4320
gccttagatt cagtaggaac taccttttta gagactccaa tctctattac ttgccttggt	4380
ttatgaagca agccttgaat cgtccatact ggaatagtac ttctgatctt gagaaatatg	4440
tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc ctgaatcttt tgactgcac tttaaccttc	4500
ttgggaaggc atttgatctc ctggagattg ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct	4560
gctgcgtagg cctctctaac catctgtggg tcagcattct ttctgaaatt gaagaggcta	4620
accttctcat tatcagtggg gaacatagtg tcgtcacctt caccttcgaa ctctctcct	4680
agatcgtaaa gatagaggaa atcgtccatt gtaatctccg gggcaaagga gatctctttt	4740
ggggctggat cactgctggg ccttttggtt cctagcgtga gccagtgggc tttttgcttt	4800
ggtgggcttg ttagggcctt agcaaagctc ttgggcttga gttgagcttc tctttgggg	4860
atgaagttca acctgtctgt ttgctgactt gttgtgtacg cgtcagctgc tgctcttgcc	4920

tctgtaatag	tggcaaattt	cttgtgtgca	actccgggaa	cgccgtttgt	tgccgccttt	4980
gtacaacccc	agtcacgtga	tataccggca	tgtggaccgt	tatacacaac	gtagtagttg	5040
atatgagggg	gttgaatacc	cgattctgct	ctgagaggag	caactgtgct	gttaagctca	5100
gattttttgt	ggattggaat	tggatcgatc	tcgatcccg	gaaattaata	cgactcacta	5160
tagggagacc	acaacgggtt	ccctctagaa	ataattttgt	ttaactttaa	gaaggagata	5220
tacccatgga	aaagcctgaa	ctcaccgcga	cgtctgtcga	gaagtttctg	atcgaaaagt	5280
tcgacagcgt	ctccgacctg	atgcagctct	cggagggcga	agaatctcgt	gctttcagct	5340
tcgatgtagg	agggcgtgga	tatgtcctgc	gggtaaatag	ctgcgccgat	ggtttctaca	5400
aagatcgtaa	tgtttatcgg	cactttgcat	cggccgcgct	cccgattccg	gaagtgcctg	5460
acattgggga	attcagcgag	agcctgacct	attgcatctc	ccgcggtgca	caggggtgca	5520
cgttgcaaga	cctgcctgaa	accgaactgc	ccgctgttct	gcagccggtc	gcggaggcta	5580
tggatgcgat	cgtgcggccc	gatcttagcc	agacgagcgg	gttcggccca	ttcggaccgc	5640
aaggaatcgg	tcaatacact	acatggcgtg	atttcatatg	cgcgattgct	gatcccatg	5700
tgtatcactg	gcaaactgtg	atggacgaca	ccgtcagtgc	gtccgtcgcg	caggctctcg	5760
atgagctgat	gctttggggc	gaggactgcc	ccgaagtccg	gcacctcgtg	cacgcggatt	5820
tcggctccaa	caatgtcctg	acggacaatg	gccgcataac	agcggtcatt	gactggagcg	5880
aggcgatgtt	cggggattcc	caatacgagg	tcgccaacat	cttcttctgg	aggccgtggt	5940
tggcttgat	ggagcagcag	acgcgtact	tcgagcggag	gcatccggag	cttgccaggat	6000
cgccgcggct	ccgggcgtat	atgctccgca	ttggtcttga	ccaactctat	cagagcttgg	6060
ttgacggcaa	tttcgatgat	gcagcttggg	cgcagggctg	atgcgacgca	atcgtccgat	6120
ccggagccgg	gactgtcggg	cgtacacaaa	tcgcccgcag	aagcgcggcc	gtctggaccg	6180
atggctgtgt	agaagtactc	gccgatagtg	gaaaccgacg	ccccagcact	cgtccgaggg	6240
caaaggaata	gtgaggtaca	gcttggatcg	atccggctgc	taacaaagcc	cgaaaggaag	6300
ctgagttggc	tgctgccacc	gctgagcaat	aactagcata	accccttggg	gcctctaaac	6360
gggtcttgag	gggttttttg	ctgaaaggag	gaactatata	cggatgatcg	ggcgcgccgt	6420
cgacggatcc	gtacgagatc	cggccggcca	gatcctgcag	gagatccaag	cttttgatcc	6480
atgcccttca	tttgccgctt	attaattaat	ttggtaacag	tccgtactaa	tcagttactt	6540
atccttcccc	catcataatt	aatcttggtg	gtctcgaatg	ccacaacact	gactagtctc	6600

```

ttggatcata agaaaaagcc aaggaacaaa agaagacaaa acacaatgag agtatccttt 6660
gcatagcaat gtctaagttc ataaaattca aacaaaaacg caatcacaca cagtggacat 6720
cacttatcca ctagctgac aggatcgccg cgtcaagaaa aaaaaactgg accccaaaag 6780
ccatgcacaa caacacgtac tcacaaaggt gtcaatcgag cagcccaaaa cattcaccaa 6840
ctcaacccat catgagccct cacatttggt gtttctaacc caacctcaaa ctcgatttct 6900
cttccgccac ctcatTTTTg tttatttcaa caccgtcaa actgcatgcc acccgtggc 6960
caaatgtcca tgcattgtaa caagacctat gactataaat agctgcaatc tcggcccagg 7020
ttttcatcat caagaaccag ttcaatatcc tagtacaccg tattaagaa ttttaagatat 7080
actgcggccg caccatggaa gcagccaaag aattggtttc catcgtccaa gaggagctcc 7140
ccaaggtgga ctatgcccg ctttggcagg atgccagcag ctgtgaggtc ctttacctct 7200
cgggtggcatt cgtggcgatc aagttcatgc tgcgccact ggacctgaag cgccaggcca 7260
ccttgaagaa gctgttcaca gcatacaact tcctcatgtc gatctattcc tttggctcct 7320
tcctggccat ggcctatgcc ctatcagtaa ctggcatcct ctccggcgac tgtgagacgg 7380
cgttcaacaa cgatgtgttc aggatcaciaa ctcatgtgtt ctacctcagc aagttcgtag 7440
agtacatcga ctcttctac ctccccctta tggacaagcc actgtcgttc cttcagttct 7500
tccatcattt gggggccccc attgacatgt ggctattcta caaataccgc aacgaaggag 7560
tctggatctt tgtcctgttg aatgggttca ttactggat catgtacggg tactattgga 7620
cgcggtcat caagctgaac ttccccatgc ccaagaacct gatcacctcc atgcagatca 7680
tccagttcaa tgtcgggttc tacatcgtct ggaagtaccg caatgtgcca tgctaccgcc 7740
aggatgggat gcgcatgttt gcctggatct tcaactactg gtatgtcggg acgggtcttg 7800
tgctgttcct caacttttac gtgcagacgt acatccggaa gccgaggaag aaccgagggg 7860
agaaggagta gc 7872

```

```

<210> 60
<211> 11706
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> pKR1150

```

```

<220>
<221> característica misc
<222> (10531)..(10531)
<223> n é a, c, g, ou t

```

<400> 60
 gtacgagatc cggccggcca gatcctgcag gagatccaag cttttgatcc atgcccttca 60
 tttgcgctt attaattaat ttggaacag tccgtactaa tcagttactt atccttcccc 120
 catcataatt aatcttggtg gtctcgaatg ccacaacact gactagtctc ttggatcata 180
 agaaaaagcc aaggaacaaa agaagacaaa acacaatgag agtatccttt gcatagcaat 240
 gtctaagttc ataaaattca aacaaaaacg caatcacaca cagtggacat cacttatcca 300
 ctagctgac aggatcgccg cgtcaagaaa aaaaaactgg accccaaaag ccatgcacaa 360
 caacacgtac tcacaaaggt gtcaatcgag cagcccaaaa cattcaccaa ctcaacccat 420
 catgagccct cacatttggt gtttctaacc caacctcaaa ctcgtattct cttccgccac 480
 ctcatttttg tttatttcaa caccgctcaa actgcatgcc accccgtggc caaatgtcca 540
 tgcatgttaa caagacctat gactataaat agctgcaatc tcggcccagg ttttcatcat 600
 caagaaccag ttcaatatcc tagtacaccg tattaaagaa ttaagatat actgcgggccg 660
 caccatggaa gcagccaaag aattggtttc catcgtccaa gaggagctcc ccaaggtgga 720
 ctatgccag ctttggcagg atgccagcag ctgtgaggtc ctttacctct cggtggcatt 780
 cgtggcgatc aagttcatgc tgcgccact ggacctgaag cgccaggcca ccttgaagaa 840
 gctgttcaca gcatacaact tctcatgtc gatctattcc tttggctcct tcttggccat 900
 ggcctatgcc ctatcagtaa ctggcatcct ctccggcgac tgtgagacgg cgttcaacaa 960
 cgatgtgttc aggatcacaa ctcagctgtt ctacctcagc aagttcgtag agtacatcga 1020
 ctctttctac cttcccctta tggacaagcc actgtcgttc cttcagttct tccatcattt 1080
 gggggccccc attgacatgt ggctattcta caaataccgc aacgaaggag tctggatcct 1140
 tgtcctgttg aatgggttca ttactggat catgtacggg tactattgga cgcggtcat 1200
 caagctgaac ttccccatgc ccaagaacct gatcacctcc atgcagatca tccagttcaa 1260
 tgtcgggttc tacatcgtct ggaagtaccg caatgtgcca tgctaccgcc aggatgggat 1320
 ggcgatgttt gcctggatct tcaactactg gtatgtcggg acggtcttgc tgctgttcct 1380
 caacttttac gtgcagacgt acatccggaa gccgaggaag aaccgaggga agaaggagta 1440
 gcggccgcaa gtatgaacta aaatgcatgt aggtgtaaga gctcatggag agcatggaat 1500
 attgtatccg accatgtaac agtataataa ctgagctcca tctcacttct tctatgaata 1560
 aacaaaggat gttatgatat attaacctc tatctatgca cttattgtt ctatgataaa 1620
 tttcctctta ttattataaa tcatctgaat cgtgacggct tatggaatgc ttcaaatagt 1680

acaaaaacaa atgtgtacta taagactttc taaacaattc taaccttagc attgtgaacg	1740
agacataagt gttaagaaga cataacaatt ataatggaag aagtttgtct ccatttatat	1800
attatatatt acccacttat gtattatatt aggatgttaa ggagacataa caattataaa	1860
gagagaagtt tgtatccatt tatatatatt atactacca tttatatatt atacttatcc	1920
acttatttaa tgtctttata aggtttgatc catgatattt ctaatatatt agttgatatg	1980
tatatgaaag ggtactattt gaactctctt actctgtata aagggtggat catccttaaa	2040
gtgggtctat ttaattttat tgcttcttac agataaaaaa aaaattatga gttgggttga	2100
taaaatattg aaggatttaa aataataata aataacatat aatatatgta tataaattta	2160
ttataatata acatttatct ataaaaaagt aaatattgtc ataaatctat acaatcgttt	2220
agccttgctg gacgaatctc aattatttaa acgagagtaa acatatttga ctttttggtt	2280
atttaacaaa ttattattta acactatatg aaattttttt ttttatcagc aaagaataaa	2340
attaaattaa gaaggacaat ggtgtcccaa tccttataca accaacttcc acaagaaagt	2400
caagtcagag acaacaaaaa aacaagcaaa ggaaattttt taatttgagt tgtcttgttt	2460
gctgcataat ttatgcagta aaacactaca cataaccctt ttagcagtag agcaatggtt	2520
gaccgtgtgc ttagcttctt ttattttatt tttttatcag caaagaataa ataaaaataa	2580
atgagacact tcagggatgt ttcaacaagc ttggcgcgcc gttctatagt gtcacctaaa	2640
tcgtatgtgt atgatacata aggttatgta ttaattgtag ccgcgttcta acgacaatat	2700
gtccatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg	2760
acaccgcga acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg gcatccgctta	2820
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc	2880
gaaacgcgag agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggta atgtcatgac	2940
caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa	3000
aggatcttct tgagatcctt tttttctgag cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc	3060
accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagta ccaactcttt ttccgaaggt	3120
aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg	3180
ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc	3240
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt	3300
accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga	3360

gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	cattgagaaa	gcgccacgct	3420
tcccgaagg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	3480
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	3540
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	3600
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatgtt	3660
ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	3720
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	gtgagcgagg	aagcgggaaga	3780
gcgcccaata	cgcaaaccgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcaggttgat	3840
cgattcgaca	tcgatctagt	aacatagatg	acaccgcgcg	cgataattta	tcctagtttg	3900
cgcgctatat	tttgttttct	atcgcgtatt	aaatgtataa	ttgcgggact	ctaatacata	3960
aaacccatct	cataaataac	gtcatgcatt	acatgttaat	tattacatgc	ttaacgtaat	4020
tcaacagaaa	ttatatgata	atcatcgcaa	gaccggcaac	aggattcaat	cttaagaaac	4080
tttattgcca	aatgtttgaa	cgatctgctt	cgacgcactc	cttctttagg	tacctcacta	4140
ttcctttgcc	ctcggacgag	tgctggggcg	toggtttcca	ctatcggcga	gtacttctac	4200
acagccatcg	gtccagacgg	ccgcgcttct	gcggggcgatt	tgtgtacgcc	cgacagtccc	4260
ggctccggat	cggacgattg	cgtcgcacgc	accctgcgcc	caagctgcat	catcgaaatt	4320
gccgtcaacc	aagctctgat	agagttggtc	aagaccaatg	cggagcatat	acgcccggag	4380
ccgcggcgat	cctgcaagct	ccggatgcct	ccgctcgaag	tagcgcgtct	gctgctccat	4440
acaagccaac	cacggcctcc	agaagaagat	gttggcgacc	tcgtattggg	aatccccgaa	4500
catcgccctg	ctccagtcaa	tgaccgctgt	tatgcggcca	ttgtccgtca	ggacattgtt	4560
ggagccgaaa	tccgcgtgca	cgaggtgccg	gacttcgggg	cagtcctcgg	cccaaagcat	4620
cagctcatcg	agagcctgcg	cgacggacgc	actgacggtg	tcgtccatca	cagtttgcca	4680
gtgatacaca	tggggatcag	caatcgcgca	tatgaaatca	cgccatgtag	tgtattgacc	4740
gattccttgc	ggtccgaatg	ggccgaaccc	gctcgtctgg	ctaagatcgg	ccgcagcgat	4800
cgcattccatg	gcctccgcga	ccggctgcag	aacagcgggc	agttcggttt	caggcaggtc	4860
ttgcaacgtg	acaccctgtg	cacggcggga	gatgcaatag	gtcaggctct	cgctgaattc	4920
cccaatgtca	agcacttccg	gaatcgggag	cgcggccgat	gcaaagtgcc	gataaacata	4980
acgatctttg	tagaaaccat	cggcgcagct	atttaccgcg	aggacatatc	cacgccctcc	5040

tacatcgaag ctgaaagcac gagattcttc gccctccgag agctgcatca ggtcggagac	5100
gctgtcgaac ttttcgatca gaaacttctc gacagacgtc gcggtgagtt caggcttttt	5160
catggtttaa taagaagaga aaagagttct tttgttatgg ctgaagtaat agagaaatga	5220
gctcgagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgcca	5280
aggatagtgg gattgtgcgt catcccttac gtcagtggag atgtcacatc aatccacttg	5340
ctttgaagac gtggttgga cgtottcttt ttccacgatg ctctcgtgg gtgggggtcc	5400
atctttggga ccaactgtcgg cagaggcatc ttgaatgata gcctttcctt tatcgcaatg	5460
atggcatttg taggagccac cttccttttc tactgtcctt tcgatgaagt gacagatagc	5520
tgggcaatgg aatccgagga gggttccga aattatcctt tgttgaaaag tctcaatagc	5580
cctttggtct tctgagactg tatctttgac atttttggag tagaccagag tgtcgtgctc	5640
caccatgttg acgaagattt tcttcttgtc attgagtcgt aaaagactct gtatgaactg	5700
ttcgccagtc ttcacggcga gttctgttag atcctcgatt tgaatcttag actccatgca	5760
tggccttaga ttcagtagga actacctttt tagagactcc aatctctatt acttgccctg	5820
gtttatgaag caagccttga atcgtccata ctggaatagt acttctgac ttgagaaata	5880
tgtctttctc tgtgttcttg atgcaattag tcctgaatct tttgactgca tctttaacct	5940
tcttggaag gtatttgatc tcctggagat tgttactcgg gtagatcgtc ttgatgagac	6000
ctgctgcgta ggcctctcta accatctgtg ggtcagcatt ctttctgaaa ttgaagaggc	6060
taaccttctc attatcagtg gtgaacatag tgtcgtcacc ttcacctcg aacttccttc	6120
ctagatcgta aagatagagg aaatcgtcca ttgtaatctc cggggcaaag gagatctctt	6180
ttggggctgg atcactgctg ggccttttg ttcttagcgt gagccagtgg gctttttgct	6240
ttggtgggct tgttagggcc ttagcaaagc tcttgggctt gagttgagct tctcctttgg	6300
ggatgaagtt caacctgtct gtttgctgac ttgttggtga cgcgtcagct gctgctcttg	6360
cctctgtaat agtggcaaatt ttcttggtg caactccggg aacgccgttt gttgccgcct	6420
ttgtacaacc ccagtcacg tatataccgg catgtggacc gttatacaca acgtagtagt	6480
tgatatgagg gtgttgaaata cccgattctg ctctgagagg agcaactgtg ctgttaagct	6540
cagatTTTTTg tgggattgga attggatcga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac	6600
tatagggaga ccacaacggt ttccctctag aaataatttt gttaaacttt aagaaggaga	6660
tatacccatg gaaaagcctg aactcaccgc gacgtctgtc gagaagtttc tgatcgaaaa	6720

gttcgacagc	gtctccgacc	tgatgcagct	ctcggagggc	gaagaatctc	gtgctttcag	6780
cttcgatgta	ggagggcgtg	gatatgtcct	gcgggtaa	agctgcgccg	atggtttcta	6840
caaagatcgt	tatgtttatc	ggcactttgc	atcggccgcg	ctcccgattc	cggaagtgc	6900
tgacattggg	gaattcagcg	agagcctgac	ctattgcata	tcccgcctg	cacaggggtg	6960
cacgttgcaa	gacctgcctg	aaaccgaact	gcccgcgtgt	ctgcagccgc	tcgcggaggc	7020
tatggatgcg	atcgcgtgcg	ccgatcttag	ccagacgagc	gggttcggcc	cattcggacc	7080
gcaaggaatc	ggtcaatata	ctacatggcg	tgatttcata	tgcgcgattg	ctgatcccca	7140
tgtgtatcac	tggcaaaactg	tgatggacga	caccgtcagt	gcgtccgtcg	cgcaggctct	7200
cgatgagctg	atgctttggg	ccgaggactg	ccccgaagtc	cggcacctcg	tgcacgcgga	7260
tttcggctcc	aacaatgtcc	tgacggacaa	tggccgcata	acagcggta	ttgactggag	7320
cgaggcgatg	ttcggggatt	cccaatacga	ggtcgccaac	atcttcttct	ggaggccgtg	7380
gttggttgt	atggagcagc	agacgcgcta	cttcgagcgg	aggcatccgg	agcttgacgg	7440
atcgccgcgg	ctccgggcgt	atatgctccg	cattggctct	gaccaactct	atcagagctt	7500
ggttgacggc	aatttcgatg	atgcagcttg	ggcgcagggt	cgatgcgacg	caatcgtccg	7560
atccggagcc	gggactgtcg	ggcgtacaca	aatcgccgcg	agaagcgcg	ccgtctggac	7620
cgatggctgt	gtagaagtac	tcgccgatag	tggaaaccga	cgccccagca	ctcgtccgag	7680
ggcaaaggaa	tagtgaggta	cagcttgat	cgatccggct	gctaacaaag	cccgaaagga	7740
agctgagttg	gctgctgcca	ccgtgagca	ataactagca	taacccttg	gggcctctaa	7800
acgggtcttg	aggggttttt	tgctgaaag	aggaactata	tccgatgat	cgggcgcgcc	7860
gtcgacggat	ccgtacgcaa	aggcaaagat	ttaaactcga	aaacattaca	aaagtctcaa	7920
aacagaggca	aggccatgca	caaagcacac	tctaagtgt	tccattgcct	actaagtagg	7980
gtacgtacac	gataccatt	caccagtgt	gatctttatt	aatatacaac	acactcagag	8040
acagcttatg	ttatagctag	ctagcataaa	ctatcacatc	atgtgttagt	acgacaagtg	8100
acaacattgc	ttttaacttc	gcggccttg	atcctctaga	ccggatataa	tgagccgtaa	8160
aaaagatga	ttaagtagta	attaatacgt	actagtaaaa	gtggcaaaag	ataacgagaa	8220
agaaccaatt	tctttgcatt	cggccttagc	ggaaggcata	tataagcttt	gattatttta	8280
tttagtgtaa	tgatttcgta	caaccaaagc	atttatttag	tactctcaca	cttgtgtcgc	8340
ggccgcttac	gccttgctcg	cctttgccac	catgcgggca	aagggtgcca	ggtagctgat	8400

caggatgccc	acccctcca	gcattggggg	gctgcgatac	ggcaagttgt	gcttcttgca	8460
caactgctcc	actttgatgc	tggccgcogt	caggttggtc	cggggcagcg	tcggccacag	8520
gtggtgctcg	atttgtaat	tcagcccacc	gaagaaccag	tccgtgacga	gtccccogtg	8580
gacgttcac	gtttcgtgaa	tctggccggc	gcaaaagccg	tggccgtccc	acaccgagtc	8640
ctggatcttc	tccagggggt	agtggttcat	gaacaccacg	atggcgatgc	cgaagcccc	8700
aagcaactcg	gacacgaaaa	acaccatgag	tccggtcaag	aagcttggca	tataaaagta	8760
gtagaacaac	gccttcaggc	cccagtggag	ggccaggccc	acgtctctct	tctcgtactg	8820
cctgcggtag	tactgggtgc	tgcgatcctt	caggcccgtg	gctgtgtgga	tgctctggaa	8880
gcaccagatg	aacctcagga	gggcacagat	gaagaagaag	tagtattgct	ggtacttgat	8940
catccgccgt	gagaacgggc	cggccctctc	cacgtcctcc	ttggaccatg	ccagcagcgg	9000
caggttggtc	atgtcggggt	cgtggccttg	cacgttggtg	gcgagtggtg	gtgcattgtg	9060
cctgtccttc	caccaggtca	cagagaaccc	ttgcaagacg	ttcccgaaaa	gcaagccgat	9120
ggcgttgttg	atcgatcggg	ccttgaacag	ctgatgggtg	cagatatcgt	gcgacaacca	9180
acccatttgt	tggaagtga	tgcccaacac	gattgccccg	acgaggtacc	agtgccactg	9240
ggcatcaat	agcaccgcga	ggaccccgag	gccagcgta	ctgagcgtct	tatatgcgta	9300
ccacatcggt	gatgcgtcga	acattcctgc	tgcgatgagc	tcattctcga	gcttgcggaa	9360
atcctcctgc	ggttcgtctg	agttgggttt	cgggtggcgta	ggcgtcagtg	gagatgatgg	9420
ttccatgata	ggcatccttc	ttagtttact	cacagcattt	tcagagtgca	taaccataaa	9480
gacatcagtg	gcatcacgac	cgcggtagtt	ctcaatgatg	tcagcaccac	ctggatgatg	9540
gttcaaccag	gcagacacat	cataggtgac	accatcaacg	gtcagcggaa	gtgctggcct	9600
tttcaccatg	gtgcggccgc	ttggggggct	atggaagact	ttcttagtta	gttgtgtgaa	9660
taagcaatgt	tgggagaatc	gggactactt	ataggatagg	aataaaacag	aaaagtatta	9720
agtgctaata	aaatatttag	actgataatt	aaaatcttca	cgtatgtcca	cttgatataa	9780
aaacgtcagg	aataaaggaa	gtacagtaga	atttaaaggt	actcttttta	tatatacccg	9840
tgttctcttt	ttggctagct	agttgcataa	aaaataatct	atatttttat	cattattttta	9900
aatatcttat	gagatggtaa	atattttatca	taattttttt	tactattatt	tattatttgt	9960
gtgtgtaata	catatagaag	ttaattacaa	attttattta	ctttttcatt	attttgatat	10020
gattcaccat	taatttagtg	ttattattta	taatagttca	ttttaatctt	tttgatatata	10080

ttatgCGTgc agtacttttt tctacatat aactactatt acatttttatt tatataatat 10140
 ttttattaat gaatttttcgt gataatatgt aatattgttc attattattt cagatttttt 10200
 aaaaatattt gtgttattat ttatgaaata tgtaattttt ttagtatttg attttatgat 10260
 gataaagtgt tctaaattca aaagaagggg gaaagcgtaa acattaaaaa acgtcatcaa 10320
 acaaaaacaa aatcttggtta ataaagataa aactgtttgt tttgatcact gttatttcgt 10380
 aatataaaaa cattatttat atttatattg ttgacaacca aatttgccta tcaaatctaa 10440
 ccaatataat gcatgCGTgg caggtaatgt actaccatga acttaagtca tgacataata 10500
 aaccgtgaat ctgaccaatg catgtacctt nctaaattgt atttgtgaca cgaagcaaatt 10560
 gattcaattc acaatggaga tgggaaacaa ataatgaaga acccagaact aagaaagctt 10620
 ttctgaaaaa taaaataaag gcaatgtcaa aagtatactg catcatcagt ccagaaagca 10680
 catgatattt ttttatcagt atcaatgcag ctagtttttat tttacaatat cgatatagct 10740
 agttttaaata tattgcagct agattttataa atatttgtgt tattatttat catttgtgta 10800
 atcctgtttt tagtatttta gtttatatat gatgataatg tattccaaat ttaaaagaag 10860
 ggaaataaat ttaacaaga aaaaaagtca tcaaacaaaa aacaaatgaa aggggtggaaa 10920
 gatgttacca tgtaatgtga atgttacagt atttctttta ttatagagtt aacaaattaa 10980
 ctaatatgat tttgttaata atgataaaat atttttttta ttattatttc ataataataa 11040
 aatagtttac ttaataataa aaaaattcta tcgttcacaa caaagttggc cacctaattt 11100
 aaccatgcat gtacccatgg accatattag gtaaccatca aacctgatga agagataaag 11160
 agatgaagac ttaagtcata acacaaaacc ataaaaaaca aaaatacaat caaccgtcaa 11220
 tctgaccaat gcatgaaaaa gctgcaatag tgagtggcga cacaagcac atgattttct 11280
 tacaacggag ataaaaccaa aaaaatattt catgaacaac ctagaacaaa taaagctttt 11340
 atataataaa tatataaata aataaaggct atggaataat atacttcaat atatttggat 11400
 taaataaatt gttggcgggg ttgatattat tatacacacc taaagtcact tcaatctcat 11460
 tttcacttaa cttttatttt ttttttcttt ttatttatca taaagagaat attgataata 11520
 tactttttta catattttta tgacattttt tattggtgaa aacttattaa aaatcataaa 11580
 ttttgtaagt tagatttatt taaagagttc ctcttcttat tttaaatttt ttaataaatt 11640
 tttaaataac taaaatttgt gttaaaaatg ttaaaaaatg tgttattaac ccttctcttc 11700
 gaggac 11706

<210> 61
 <211> 5146
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> pKR1173

<400> 61
 cgcgcccgat catccggata tagttcctcc tttcagcaaa aaaccctca agaccggtt 60
 agaggcccca aggggttatg ctagttattg ctacagcgtg gcagcagcca actcagcttc 120
 ctttcgggct ttgttagcag ccggatcgat ccaagctgta cctcactatt cctttgccct 180
 cggacgagtg ctggggcgtc ggtttccact atcggcgagt acttctacac agccatcggt 240
 ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg tgtacgccc acagtcccgg ctccggatcg 300
 gacgattgag tcgcatcgac cctgcgcca agctgcatca tcgaaattgc cgtcaaccaa 360
 gctctgatag agttgggtcaa gaccaatgag gagcatatac gcccgagcc gcggcgatcc 420
 tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta gcgcgtctgc tgctccatac aagccaacca 480
 cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc gtattgggaa tccccgaaca tcgcctcgct 540
 ccagtcaatg accgctgtta tgcggccatt gtccgtcagg acattgttgg agccgaaatc 600
 cgcgtgcag aggtgccgga cttcggggca gtccctggcc caaagcatca gctcatcgag 660
 agcctgcgag acggacgcac tgacggtgtc gtccatcaca gtttgccagt gatacacatg 720
 gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg ccatgtagtg tattgaccga ttccttgagg 780
 tccgaatggg ccgaaccgag tcgtctggct aagatcgagg gcagcgatcg catccatagc 840
 ctccgcgacc ggctgcagaa cagcgggagc ttccggtttc ggcaggtctt gcaacgtgac 900
 accctgtgca cggcgaggaga tgcaataggt caggctctcg ctgaattccc caatgtcaag 960
 cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc aaagtgcga taaacataac gatctttgta 1020
 gaaaccatcg gcgcagctat ttaccgcag gacatatcca cgcctccta catcgaagct 1080
 gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag ctgcatcagg tcggagacgc tgtcgaactt 1140
 ttcgatcaga aacttctcga cagacgtcgc ggtgagttca ggcttttcca tgggtatatc 1200
 tccttcttaa agttaaaca aattatttct agagggaac cgttgtggtc tccttatagt 1260
 gagtcgtatt aatttcgagg gatcgagatc tgatcaacct gcattaatga atcggccaac 1320
 gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgcg ttctcgcgc actgactcgc 1380
 tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg 1440

tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	1500
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg	1560
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	1620
accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta	1680
cgggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct	1740
gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	1800
cgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgcgtta	1860
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	1920
taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg ggctaacta cggctacact agaaggacag	1980
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	2040
gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta	2100
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	2160
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgac attaacctat aaaaataggc	2220
gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca	2280
tgcagctccc ggagacgggc acagcttggtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc	2340
gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag	2400
agcagattgt actgagagtg caccatatgg acatattgtc gttagaacgc ggctacaatt	2460
aatacataac cttatgtatc atacacatac gatttaggtg aactataga acggcgcgcc	2520
gtcgacggat ccgtacgaga tccggccggc cagatcctgc aggagatcca agcttttgat	2580
ccatgccctt catttgccgc ttattaatta atttggtaac agtccgtact aatcagttac	2640
ttatccttcc cccatcataa ttaatcttgg tagtctcgaa tgccacaaca ctgactagtc	2700
tcttgatca taagaaaaag ccaaggaaca aaagaagaca aaacacaatg agagtatcct	2760
ttgcatagca atgtctaagt tcataaaatt caaacaaaaa cgcaatcaca cacagtggac	2820
atcacttacc cactagctga tcaggatcgc cgcgtcaaga aaaaaaaact ggaccccaaa	2880
agccatgcac aacaacacgt actcaciaag gtgtcaatcg agcagcccaa aacattcacc	2940
aactcaaccc atcatgagcc ctcacatttg ttgtttctaa cccaacctca aactcgtatt	3000
ctcttcggcc acctcatttt tgtttatttc aacaccgctc aaactgcatg ccaccccggtg	3060
gccaaatgtc catgcatgtt aacaagacct atgactataa atagctgcaa tctcggccca	3120

ggttttcatc atcaagaacc agttcaatat cctagtacac cgtattaaag aatttaagat 3180
 atactgcggc cgcaccatgg aagcagccaa agaattgggt tccatcgtcc aagaggagct 3240
 ccccaaggtg gactatgccc agctttggca ggatgccagc agctgtgagg tcctttacct 3300
 ctcggtggca ttcgtggcga tcaagttcat gctgcgcca ctggacctga agcgccaggc 3360
 caccttgaag aagctgttca cagcatacaa ctctctcatg tcgatctatt cctttggctc 3420
 ctctctggcc atggcctatg ccctatcagt aactggcatc ctctccggcg actgtgagac 3480
 ggcgttcaac aacgatgtgt tcaggatcac aactcagctg ttctacctca gcaagttcgt 3540
 agagtacatc gactccttct accttccctt tatggacaag cactgtcgt tccttcagtt 3600
 ctccatcat ttgggggccc ccattgacat gtggctattc taaaataacc gcaacgaagg 3660
 agtctggatc tttgtcctgt tgaatgggtt cattcactgg atcatgtacg gttactattg 3720
 gacgcggctc atcaagctga acttccccat gcccaagaac ctgatcacct ccatgcagat 3780
 catccagttc aatgtcgggt tctacatcgt ctggaagtac cgcaatgtgc catgctaccg 3840
 ccaggatggg atgcgcatgt ttgcctggat cttcaactac tggtatgtcg ggacggtctt 3900
 gctgctgttc ctcaactttt acgtgcagac gtacatccgg aagccgagga agaaccgagg 3960
 gaagaaggag tagcggccgc aagtatgaac taaaatgcat gtaggtgtaa gagctcatgg 4020
 agagcatgga atattgtatc cgaccatgta acagtataat aactgagctc catctcactt 4080
 ctctatgaa taaacaaagg atgttatgat atattaacac tctatctatg caccttattg 4140
 ttctatgata aatttcctct tattattata aatcatctga atcgtgacgg cttatggaat 4200
 gcttcaaata gtacaaaaac aaatgtgtac tataagactt tctaaacaat tctaacctta 4260
 gcattgtgaa cgagacataa gtgttaagaa gacataacaa ttataatgga agaagtttgt 4320
 ctccatttat atattatata ttaccactt atgtattata ttaggatgtt aaggagacat 4380
 aacaattata aagagagaag tttgtatcca ttatatatt atatactacc catttatata 4440
 ttatacttat ccacttattt aatgtcttta taaggtttga tccatgatat ttctaattat 4500
 ttagttgata tgtatatgaa aggtactat ttgaactctc ttactctgta taaaggttgg 4560
 atcatcctta aagtgggtct atttaatttt attgcttctt acagataaaa aaaaaattat 4620
 gagttggttt gataaaatat tgaaggattt aaaataataa taaataacat ataatatatg 4680
 tatataaatt tattataata taacatttat ctataaaaaa gtaaatattg tcataaatct 4740
 atacaatcgt ttagccttgc tggacgaatc tcaattattt aaacgagagt aaacatatatt 4800

gacttttttg ttatttaaca aattattatt taacactata tgaaatTTTT ttttttatca 4860
gcaaagaata aaattaaatt aagaaggaca atgggtgtccc aatccttata caaccaactt 4920
ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca aaggaaatTT ttttaatttga 4980
gttgctcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta cacataaccc ttttagcagt 5040
agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta tttttttatc agcaaagaat 5100
aaataaaata aaatgagaca cttcagggat gtttcaacaa gcttgg 5146

<210> 62
<211> 5250
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> pKR393

<400> 62
gatcccccg gctgcaggaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 60
cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 120
agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 180
cgctgatgc ggtattttct ccttacgcac ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc 240
actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca 300
cccgtgacg cgccctgacg ggcttgctctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg 360
accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgaga 420
cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct 480
tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 540
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 600
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 660
gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 720
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtgaagatc 780
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 840
tgtggcgcggt tattatcccgt tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 900
tattctcaga atgacttgggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 960
atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac 1020
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg ctttttttga caacatgggg 1080

gatcatgtaa	ctcgcccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	1140
gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	1200
gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	1260
gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	1320
gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	1380
cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	1440
atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	1500
tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	1560
ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	1620
gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	1680
tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgctacca	gcggtgggtt	gtttgccgga	tcaagagcta	1740
ccaactcttt	ttccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	1800
ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	1860
gctctgctaa	tctgttacc	agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	1920
ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcgagcggg	cgggctgaac	gggggggttcg	1980
tgcacacagc	ccagcttggg	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	2040
ctatgagaaa	gcgccacgct	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggatatcc	ggtaagcggc	2100
agggtcggaa	caggagagcg	cacgagggag	cttcaggggg	gaaacgcctg	gtatctttat	2160
agtcctgtcg	ggtttcgcc	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	2220
gggcgagacc	tatggaaaaa	cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	2280
tggccttttg	ctcacatggt	ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	2340
accgcctttg	agtgagctga	taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	2400
gtgagcgagg	aagcggaaga	gcgccaata	cgcaaaccgc	ctctccccgc	gcgttggccg	2460
attcattaat	gcagctggca	cgacaggttt	cccgactgga	aagcgggcag	tgagcgcaac	2520
gcaattaatg	tgagttagct	cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	2580
gctcgtatgt	tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	2640
catgattacg	ccaagcttgc	atgcctgcag	gctagcctaa	gtacgtactc	aaaatgccaa	2700
caaataaaaa	aaaagttgct	ttaataatgc	caaaacaaat	taataaaaaca	cttacaacac	2760

cggatttttt	ttaattaaaa	tgtgccattt	aggataaata	gttaatat	ttataatta	2820
tttaaaaagc	cgtatctact	aaaatgattt	ttatttggtt	gaaaatatta	atatgtttaa	2880
atcaacacaa	tctatcaaaa	ttaactaaa	aaaaaaataa	gtgtacgtgg	ttaacattag	2940
tacagtaata	taagaggaaa	atgagaaatt	aagaaattga	aagcgagtct	aattttttaa	3000
ttatgaacct	gcatatataa	aaggaaagaa	agaatccagg	aagaaaagaa	atgaaaccat	3060
gcatggtccc	ctcgtcatca	cgagtttctg	ccatttgcaa	tagaaacact	gaaacacctt	3120
tctctttgtc	acttaattga	gatgccgaag	ccacctcaca	ccatgaactt	catgaggtgt	3180
agcacccaag	gcttccatag	ccatgcatac	tgaagaatgt	ctcaagctca	gcaccctact	3240
tctgtgacgt	gtccctcatt	caccttctc	tcttccctat	aaataaccac	gcctcaggtt	3300
ctccgcttca	caactcaaac	attctctcca	ttggtcctta	aacactcatc	agtcatacacc	3360
gcggccgcca	attcaggtgc	ccatgatggt	ggccgcaggc	tatcttctag	tgtctcgggc	3420
cgctcgccag	agcttccagc	aggacattga	caaccccaac	ggggcctact	cgacctcgtg	3480
gactggcctg	cccattgtga	tgtctgtggt	ctatctcagc	ggtgtgtttg	ggctcacaaa	3540
gtacttcgag	aaccggaagc	ccatgacggg	gctgaaggac	tacatgttca	cttacaatct	3600
ctaccaggtg	atcatcaacg	tgtggtgcgt	ggtggccttt	ctcctggagg	tgcggcgtgc	3660
gggcatgtca	ctcatcgga	ataaggtgga	ccttggggccc	aactccttca	ggctcggtct	3720
cgtcacgtgg	gtgcactaca	acaacaagta	cgtggagctc	ctcgacaccc	tatggatggt	3780
gctgcgcaag	aagacgcagc	aggtctcctt	cctccacgtc	tatcatcacg	tgttctgat	3840
gtgggcctgg	ttcgttgtcg	tcaagctcgg	caatggtggt	gacgcatatt	ttggcggtct	3900
catgaactcg	atcatccacg	tgatgatgta	ttcctactac	accatggcgc	tcctgggctg	3960
gtcatgcccc	tggaagcgct	acctcacgca	ggcacagctc	gtgcagtttt	gcatctgcct	4020
cgcccactcc	acatgggcgg	cagtaacggg	tgcctacccg	tggcgaattt	gcttgggtgga	4080
ggtgtgggtg	atggtgtcca	tgtgtgtgct	cttcacacgc	ttctaccgcc	aggcctatgc	4140
caaggaggcg	aaggccaagg	aggcgaaaaa	gctcgcacag	gaggcatcac	aggccaaggc	4200
ggtcaaggcg	gagtaagtca	ctggaggtgg	accgcacatg	caccacgggc	ccggcgagca	4260
gcatggttcg	gcgagtcagg	cccggtcatg	cgtcatggtt	ggagtttgca	gggcggcagg	4320
tgatgcctc	cgccatgcac	ggccacaggc	acagccggtc	ctctggacgt	cccaactttc	4380
aaccgtggtg	caaagcacgc	tggcgaccgc	gagcagcagt	cagcgcagcg	tgttatcaca	4440

```

gtgtcgctgg ctgcacgtgc tctctccatc gcggccgcat ttcgcaccaa atcaatgaaa 4500
gtaataatga aaagtctgaa taagaatact taggcttaga tgcctttgtt acttgtgtaa 4560
aataacttga gtcattgtacc tttggcggaa acagaataaa taaaagggtga aattccaatg 4620
ctctatgtat aagttagtaa tacttaatgt gttctacggt tgtttcaata tcatcaaact 4680
ctaattgaaa ctttagaacc acaaatctca atcttttctt aatgaaatga aaaatcttaa 4740
ttgtaccatg tttatgttaa acaccttaca attgggttga gaggaggacc aaccgatggg 4800
acaacattgg gagaagaga ttcaatggag atttgatag gagaacaaca ttctttttca 4860
cttcaatata agatgagtgc aactactaagg atatgtatga gactttcaga agctacgaca 4920
acatagatga gtgagggtgt gattcctagc aagaaagaca ttagaggaag ccaaaatcga 4980
acaaggaaga catcaagggc aagagacagg accatccatc tcaggaaaag gagctttggg 5040
atagtccgag aagttgtaca agaaattttt tggagggtga gtgatgcatt gctggtgact 5100
ttaactcaat caaaattgag aaagaaagaa aaggaggagg gctcacatgt gaatagaagg 5160
gaaacgggag aattttacag ttttgatcta atgggcatcc cagctagtgg taacatatcc 5220
accatgttta accttcacgt acgtctagag 5250

```

```

<210> 63
<211> 4140
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> pKR407

```

```

<400> 63
ggccgcattt cgcaccaa atcaatgaa agtctgaata agaataactta 60
ggcttagatg cttttgttac ttgtgtaaaa taacttgagt catgtacctt tggcggaaac 120
agaataaata aaagggtgaaa ttccaatgct ctatgtataa gttagtaata cttaatgtgt 180
tctacgggtt tttcaatata atcaaactct aattgaaact ttagaaccac aaatctcaat 240
cttttcttaa tgaaatgaaa aatcttaatt gtaccatggt tatgttaa accttacaat 300
tggttgagga ggaggaccaa ccgatgggac aacattggga gaaagagatt caatggagat 360
ttggatagga gaacaacatt ctttttccact tcaatacaag atgagtgcaa cactaaggat 420
atgtatgaga ctttcagaag ctacgacaac atagatgagt gaggtggtga ttcttagcaa 480
gaaagacatt agaggaagcc aaaatcgaac aaggaagaca tcaagggcaa gagacaggac 540
catccatctc agggaaaagga gctttgggat agtccgagaa gttgtacaag aaattttttg 600

```

gaggggtgagt gatgcattgc tggtgacttt aactcaatca aaattgagaa agaaagaaaa	660
gggaggggggc tcacatgtga atagaaggga aacgggagaa ttttacagtt ttgatctaata	720
gggcatccca gctagtggta acatattcac catgtttaac cttcacgtac gtctagagga	780
tcccccgggc tgcaggaatt cactggcogt cgtttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc	840
tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag	900
cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgagc agcctgaatg gcgaatggcg	960
cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcgggtatt tcacaccgca tatggtgcac	1020
tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc	1080
cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac	1140
cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg	1200
aaagggcctc gtgatacgcc tattttttata ggttaatgtc atgataataa tggttttctta	1260
gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tattttttcta	1320
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata	1380
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc	1440
ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	1500
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	1560
tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg	1620
tggcgcggtta ttatcccgta ttgacgccg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta	1680
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	1740
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt	1800
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	1860
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga	1920
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga	1980
actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc	2040
aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	2100
cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	2160
tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	2220
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata	2280

tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct	2340
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	2400
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcccttt tttctgcgcg taatctgctg	2460
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc	2520
aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct	2580
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	2640
tctgctaata ctgttaccag tggtctgtgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	2700
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctc ggctgaacgg ggggttcgtg	2760
cacacagccc agcttggagc gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagct	2820
atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	2880
ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	2940
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg	3000
gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg	3060
gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac	3120
cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt	3180
gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat	3240
tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc	3300
aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttccggc	3360
tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca	3420
tgattacgcc aagcttgcat gcctgcaggc tagcctaagt acgtactcaa aatgccaaaca	3480
aataaaaaaa aagttgcttt aataatgcca aaacaaatta ataaaacact tacaacaccg	3540
gatttttttt aattaaaatg tgccatttag gataaatagt taatatTTTT aataattatt	3600
taaaagccg tatctactaa aatgattttt atttggttga aaatattaat atgtttaaat	3660
caacacaatc tatcaaaatt aaactaaaaa aaaaataagt gtacgtggtt aacattagta	3720
cagtaatata agaggaaaat gagaaattaa gaaattgaaa gcgagtctaa tttttaaatt	3780
atgaacctgc atatataaaa ggaaagaaag aatccaggaa gaaaagaaat gaaacctgc	3840
atggtcccct cgtcatcacg agtttctgcc atttgcaata gaaacactga aacacctttc	3900
tctttgtcac ttaattgaga tgccgaagcc acctcacacc atgaacttca tgagggtgag	3960

cacccaaggc ttccatagcc atgcatactg aagaatgtct caagctcagc accctacttc 4020
 tgtgacgtgt ccctcattca ccttcctctc ttccctataa ataaccacgc ctcagggttct 4080
 ccgcttcaca actcaaacat tctctccatt ggtccttaaa cactcatcag tcatcaccgc 4140
 <210> 64
 <211> 5414
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> pKR1176
 <400> 64
 ggccgcattt cgcaccaaat caatgaaagt aataatgaaa agtctgaata agaataactta 60
 ggcttagatg cctttgttac ttgtgtaaaa taacttgagt catgtacctt tggcggaaac 120
 agaataaata aaagggtgaaa ttccaatgct ctatgtataa gttagtaata cttaatgtgt 180
 tctacggttg tttcaatata atcaaactct aattgaaact ttagaaccac aaatctcaat 240
 cttttcttaa tgaaatgaaa aatcttaatt gtaccatgtt tatgttaaac accttacaat 300
 tggttggaga ggaggaccaa ccgatgggac aacattggga gaaagagatt caatggagat 360
 ttggatagga gaacaacatt ctttttctact tcaatacaag atgagtgcaa cactaaggat 420
 atgtatgaga ctttcagaag ctacgacaac atagatgagt gaggtggtga ttccctagcaa 480
 gaaagacatt agaggaagcc aaaatcgaac aaggaagaca tcaagggcaa gagacaggac 540
 catccatctc aggaaaagga gctttgggat agtccgagaa gttgtacaag aaattttttg 600
 gaggggtgagt gatgcattgc tggtgacttt aactcaatca aaattgagaa agaaagaaaa 660
 gggagggggc tcacatgtga atagaaggga aacgggagaa ttttacagtt ttgatctaat 720
 gggcatccca gctagtggta acatattcac catgtttaac cttcacgtac gtctagagga 780
 tccccgggc tgcaggaatt cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc 840
 tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag 900
 cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg 960
 cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac 1020
 tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc 1080
 cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac 1140
 cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg 1200
 aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc atgataataa tggtttctta 1260

gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt ggcgcgaacc cctatttggt tattttttcta	1320
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata	1380
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttcccggtc gcccttattc ctttttttgc	1440
ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga	1500
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct	1560
tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg	1620
tggcgcggtta ttatcccgta ttgacgcgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta	1680
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat	1740
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaacactg cggccaactt	1800
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga	1860
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgcga	1920
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga	1980
actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgtc	2040
aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	2100
cggtagcgt gggctcgcg gtatcattgc agcactggg ccagatggta agccctccc	2160
tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	2220
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata	2280
tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct	2340
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	2400
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg	2460
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc	2520
aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct	2580
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	2640
tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt	2700
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg	2760
cacacagccc agcttgagc gaacgacct caccgaactg agatacctac agcgtgagct	2820
atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	2880
ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag	2940

tccgtgctggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	3000
gcggagccta	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	ccttttgctg	3060
gccttttgct	cacatgttct	ttcctgcgtt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	3120
cgcctttgag	tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	3180
gagcgaggaa	gcggaagagc	gcccaatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	3240
tcattaatgc	agctggcacg	acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	3300
aattaatgtg	agttagctca	ctcattaggc	accccaggct	ttacaacttta	tgcttcgggc	3360
tcgtatgttg	tgtggaattg	tgagcggata	acaatttcac	acaggaaaca	gctatgacca	3420
tgattacgcc	aagcttgcct	gcctgcaggc	tagcctaagt	acgtactcaa	aatgccaaca	3480
aataaaaaaa	aagttgcttt	aataatgcc	aaacaaatta	ataaaacact	tacaacaccg	3540
gatttttttt	aattaaaatg	tgccatttag	gataaatagt	taatatTTTT	aataattatt	3600
taaaaagccg	tatctactaa	aatgattttt	atttggttga	aaatattaat	atgtttaaat	3660
caacacaatc	tatcaaaatt	aaactaaaaa	aaaaataagt	gtacgtgggt	aacattagta	3720
cagtaatata	agaggaaaat	gagaaattaa	gaaattgaaa	gcgagtctaa	tttttaaatt	3780
atgaacctgc	atatataaaa	ggaaagaaag	aatccaggaa	gaaaagaaat	gaaaccatgc	3840
atggtcccct	cgatcatcag	agtttctgcc	atttgcaata	gaaacactga	aacaccttcc	3900
tctttgtcac	ttaattgaga	tgccgaagcc	acctcacacc	atgaacttca	tgaggtgtag	3960
caccaagggc	ttccatagcc	atgcatactg	aagaatgtct	caagctcagc	accctacttc	4020
tgtgacgtgt	ccctcattca	ccttcctctc	ttccctataa	ataaccacgc	ctcaggttct	4080
ccgcttcaca	actcaaacat	tctctccatt	ggtccttaaa	cactcatcag	tcatcaccgc	4140
ggccgcacca	tggtgaaaag	gccagcactt	ccgctgaccg	ttgatggtgt	cacctatgat	4200
gtgtctgcct	ggttgaacca	tcatccaggg	ggtgctgaca	tcattgagaa	ctaccgcggt	4260
cgtgatgcc	ctgatgtctt	tatggttatg	cactctgaaa	atgctgtgag	taaactaaga	4320
aggatgcta	tcattggaacc	atcatctcca	ctgacgccta	cgccaccgaa	accaactca	4380
gacgaaccgc	aggaggattt	ccgcaagctc	cgagatgagc	tcatcgagc	aggaatgttc	4440
gacgcatac	cgatgtggta	cgcatataag	acgctcagta	cgctgggcct	cggggctctc	4500
gcggtgctat	tgatgacca	gtggcactgg	tacctcgctg	gggcaatcgt	gttgggcatt	4560
cacttccaac	aaatgggttg	gttgtcgcac	gatatctgcc	accatcagct	gttcaaggac	4620

cgatcgatca acaacgccat cggcttgctt ttcgggaacg tcttgcaagg gttctctgtg 4680
 acctggtgga aggacaggca caatgcacac cactccgcca ccaacgtgca aggccacgac 4740
 cccgacattg acaacctgcc gctgctggca tggccaagg aggacgtgga gagggccggc 4800
 ccgttctcac ggcggatgat caagtaccag caatactact tcttcttcat ctgtgccctc 4860
 ctgaggttca tctggtgctt ccagagcatc cacacagcca cgggcctgaa ggatcgagc 4920
 aaccagtact accgcaggca gtacgagaaa gagagcgtgg gcctggccct cactggggc 4980
 ctgaaggcgt tgttctacta cttttatatg ccaagcttct tgaccggact catggtgttt 5040
 ttcgtgtccg agttgcttgg gggcttcggc atcgccatcg tgggtgttcat gaaccactac 5100
 cccctggaga agatccagga ctcggtgtgg gacggccacg gcttttgcg cggccagatt 5160
 cacgaaacga tgaacgtcca gcggggactc gtcacggact gggtcttcgg tgggctgaat 5220
 taccaaatcg agcaccacct gtggccgacg ctgccccggc acaacctgac ggcggccagc 5280
 atcaaagtgg agcagttgtg caagaagcac aacttgccgt atcgagccc cccaatgctg 5340
 gagggggtgg gcatcctgat cagctacctg ggcaccttg cccgcatggt ggcaaaggcc 5400
 gacaaggcgt aagc 5414

<210> 65

<211> 7907

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> pKR1178

<400> 65

ggagatccaa gcttttgatc catgcccttc atttgccgct tattaattaa ttggttaaca 60
 gtccgtacta atcagttact tacccttccc ccatcataat taatcttggg agtctcgaat 120
 gccacaacac tgactagtct cttggatcat aagaaaaagc caaggaacaa aagaagacaa 180
 aacacaatga gagtatcctt tgcatagcaa tgtctaagtt cataaaattc aaacaaaaac 240
 gcaatcacac acagtggaca tcacttatcc actagctgat caggatcgcc gcgtcaagaa 300
 aaaaaaactg gaccccaaaa gccatgcaca acaacacgta ctcacaaagg tgtcaatcga 360
 gcagcccaaa acattcacca actcaaccca tcatgagccc tcacatttgt tgtttctaac 420
 ccaacctcaa actcgtattc tcttccgcca cctcattttt gtttatttca acaccogtca 480
 aactgcatgc caccctgtgg ccaaatgtcc atgcatgtta acaagaccta tgactataaa 540
 tagctgcaat ctcggccag gttttcatca tcaagaacca gttcaatata ctagtacacc 600

gtattaaaga atttaagata tactgcggcc gcaccatgga agcagccaaa gaattggttt	660
ccatcgtcca agaggagctc cccaaggtgg actatgcccc gctttggcag gatgccagca	720
gctgtgaggt cctttacctc tcggtggcat tcgtggcgat caagttcatt ctgcgcccac	780
tggacctgaa gcgccaggcc accttgaaga agctgttcac agcatacaac ttctcatgt	840
cgatctattc ctttggctcc ttctggcca tggcctatgc cctatcagta actggcatcc	900
tctccggcga ctgtgagacg gcgttcaaca acgatgtgtt caggatcaca actcagctgt	960
tctacctcag caagttcgta gactacatcg actccttcta ccttccccctt atggacaagc	1020
cactgtcgtt ccttcagttc ttccatcatt tgggggcccc cattgacatg tggctattct	1080
acaaataccg caacgaagga gtctggatct ttgtcctgtt gaatgggttc attcactgga	1140
tcatgtacgg ttactattgg acgcggctca tcaagctgaa cttccccatg cccaagaacc	1200
tgatcacctc catgcagatc atccagttca atgtcgggtt ctacatcgtc tggaagtacc	1260
gcaatgtgcc atgtaccgc caggatggga tgcgcatgtt tgccctggatc ttcaactact	1320
ggatgtcgg gacggctctg ctgctgttcc tcaactttta cgtgcagacg tacatccgga	1380
agccgaggaa gaaccgaggg aagaaggagt agcggccgca agtatgaact aaaatgcatg	1440
taggtgtaag agctcatgga gagcatggaa tattgtatcc gaccatgtaa cagtataata	1500
actgagctcc atctcacttc ttctatgaat aaacaaagga tgttatgata tattaacact	1560
ctatctatgc accttattgt tctatgataa atttctctt attattataa atcatctgaa	1620
tcgtgacggc ttatggaatg cttcaaatag taaaaaaca aatgtgtact ataagacttt	1680
ctaaacaatt ctaaccttag cattgtgaac gagacataag tgtaagaag acataacaat	1740
tataatggaa gaagtttgtc tccatttata tattatatat taccactta tgtattatat	1800
taggatgtta aggagacata acaattataa agagagaagt ttgtatccat ttatatatta	1860
tatactaccc atttatatat tatacttata cacttattta atgtctttat aaggtttgat	1920
ccatgatatt tctaataatt tagttgatat gtatatgaaa gggactatt tgaactctct	1980
tactctgtat aaaggttgga tcatccttaa agtgggtcta ttaatttta ttgcttctta	2040
cagataaaaa aaaaattatg agttggttg ataaaaatatt gaaggattta aaataataat	2100
aaataacata taatatatgt atataaattt attataatat aacatttatc tataaaaaag	2160
taaatattgt cataaatcta tacaatcgtt tagccttgct ggacgaatct caattattta	2220
aacgagagta aacatatttg actttttggt tatttaacaa attattattt aacactatat	2280

gaaatTTTTT tttttatcag caaagaataa aattaaatta agaaggacaa tgggtgtccca	2340
atccttatac aaccaacttc cacaagaaag tcaagtcaga gacaacaaaa aaacaagcaa	2400
aggaaatTTTt ttaatttgag ttgtcttggt tgctgcataa tttatgcagt aaaacactac	2460
acataaccct ttttagcagta gagcaatggt tgaccgtgtg cttagcttct tttatTTTat	2520
TTTTttatca gcaaagaata aataaaataa aatgagacac ttcagggatg tttcaacaag	2580
cttggcgcgC ccgatcatcc ggatatagtt cctcctttca gcaaaaaacc cctcaagacc	2640
cgttttagagg ccccaagggg ttatgctagt tattgctcag cgggtggcagc agccaactca	2700
gcttcctttc gggctttggt agcagccgga tcgatccaag ctgtacctca ctattccttt	2760
gccctcggac gagtgctggg gcgtcggttt ccactatcgg cgagtacttc tacacagcca	2820
tcggtccaga cggccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgacagt cccggctccg	2880
gatcggacga ttgcgtcgca tcgacctgc gcccaagctg catcatcgaa attgcctgca	2940
accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgcccg gagccgcggc	3000
gatcctgcaa gctccggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgctgctc catacaagcc	3060
aaccacggcc tccagaagaa gatgttggcg acctcgtatt gggaatcccc gaacatcgcc	3120
tcgctccagt caatgaccgc tgttatgcgg ccattgtccg tcaggacatt gttggagccg	3180
aaatccgcgt gcacgaggtg ccggacttcg gggcagtcct cggcccaaag catcagctca	3240
tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg ccagtgatac	3300
acatggggat cagcaatcgc gcatatgaaa tcacgccatg tagtgtattg accgattcct	3360
tgcgggtccga atgggcccga cccgctcgtc tggctaagat cggccgcagc gatcgcatcc	3420
atagcctccg cgaccggctg cagaacagcg ggcagttcgg tttcaggcag gtcttgcaac	3480
gtgacaccct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgtgaa ttccccaatg	3540
tcaagcactt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac ataacgatct	3600
ttgtagaaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccacgccc tcctacatcg	3660
aagctgaaag cagcagattc ttcgccctcc gagagctgca tcaggctcgga gacgctgtcg	3720
aacttttcga tcagaaactt ctcgacagac gtgcgggtga gttcaggctt ttccatgggt	3780
atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagagg gaaaccgttg tggctcctc	3840
atagtgagtc gtattaattt cgcgggatcg agatctgac aacctgcatt aatgaatcgg	3900
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga	3960

ctcgcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	4020
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca	4080
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	4140
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata	4200
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	4260
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	4320
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgctcgtcc aagctgggct gtgtgcacga	4380
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	4440
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	4500
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag	4560
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcgaaaaa gagttggtag	4620
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca	4680
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	4740
cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgacattaa cctataaaaa	4800
taggcgtatc acgaggccct ttogtctcgc gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg	4860
acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	4920
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtggttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc	4980
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgttag aacgoggcta	5040
caattaatac ataaccttat gtatcataca catacgattt aggtgacact atagaacggc	5100
gcgccgtcga cggatccgta cgagatccgg ccggccagat cctgcagccc gggggatcct	5160
ctagacgtac gtgaaggtta aacatggtga atatgttacc actagctggg atgccatta	5220
gatcaaaact gtaaaattct ccggtttccc ttctattcac atgtgagccc cctccctttt	5280
ctttctttct caattttgat tgagttaaag tcaccagcaa tgcactactc accctccaaa	5340
aaatttcttg tacaattctt cggaactatcc caaagctcct ttctctgaga tggatggtcc	5400
tgtctcttgc ccttgatgtc ttcttgttc gattttggct tcctctaatag tctttcttgc	5460
taggaatcac cacctcactc atctatgttg tcgtagcttc tgaaagtctc atacatatcc	5520
ttagtgttgc actcatcttg tattgaagtg aaaaagaatg ttgttctcct atccaaatct	5580
ccattgaatc tctttctccc aatgttgctc catcggttgg tcctcctctc caaccaattg	5640

taaggtgttt aacataaaca tggtaacaatt aagatttttc atttcattaa gaaaagattg	5700
agatttgtgg ttctaaagtt tcaattagag tttgatgata ttgaaacaac cgtagaacac	5760
attaagtatt actaacttat acatagagca ttggaatttc accttttatt tattctgttt	5820
ccgccaaagg tacatgactc aagttatttt acacaagtaa caaaggcatc taagcctaag	5880
tattcttatt cagacttttc attattactt tcattgattt ggtgcgaaat gcggccgctt	5940
acgccttgtc ggcctttgcc accatgcggg caaagggtgcc caggtagctg atcaggatgc	6000
ccaccccctc cagcattggg gggctgcgat acggcaagtt gtgcttcttg cacaactgct	6060
ccaacttgat gctggccgcc gtcaggttgt gccggggcag cgtcggccac aggtggtgct	6120
cgatttggtta attcagccca ccgaagaacc agtccgtgac gagtccccgc tggacgttca	6180
tcgtttcgtg aatctggccg gcgcaaaagc cgtggccgtc ccacaccgag tcctggatct	6240
tctccagggg gtagtggttc atgaacacca cgatggcgat gccgaagccc ccaagcaact	6300
cggacacgaa aaacaccatg agtccggtca agaagcttgg catataaaag tagtagaaca	6360
acgccttcag gccccagtgg agggccaggc ccacgctctc tttctcgtae tgectgcggt	6420
agtactggtt gctgcgatcc ttcaggcccg tggctgtgtg gatgctctgg aagcaccaga	6480
tgaacctcag gagggcacag atgaagaaga agtagtattg ctggtacttg atcatccgcc	6540
gtgagaacgg gccggccctc tccacgtcct ccttggaaca tgccagcagc ggcaggttgt	6600
caatgtcggg gtcgtggcct tgcacgttgg tggcggagtg gtgtgcattg tgectgtcct	6660
tccaccaggt cacagagaac ccttgcaaga cgttcccgaa aagcaagccg atggcgttgt	6720
tgatcgatcg gtccttgaac agctgatggt ggcagatata gtgcgacaac caaccattt	6780
gttggaagtg aatgcccaac acgattgccc cgacgaggtta ccagtgccac tgggtcatca	6840
atagcaccgc gaggaccccg agggccagcg tactgagcgt cttatatgcg taccacatcg	6900
gtgatgcgtc gaacattcct gctgcgatga gctcatctcg gagcttgcgg aaatcctcct	6960
gcggttcgtc tgagttgggt ttcggtggcg taggcgtcag tggagatgat ggttccatga	7020
taggcatacct tcttagttta ctacagcat tttcagagtg cataaccata aagacatcag	7080
tggcatcacg accgcggtag ttctcaatga tgtcagcacc ccctggatga tggttcaacc	7140
aggcagacac atcataggtg acaccatcaa cggtcagcgg aagtgctggc cttttcacca	7200
tgggtcggcc gcggtgatga ctgatgagtg ttttaaggacc aatggagaga atgtttgagt	7260
tgtgaagcgg agaacctgag gcgtggttat ttataggga gagaggaagg tgaatgaggg	7320

acacgtcaca gaagtaggggt gctgagcttg agacattctt cagtatgcat ggctatggaa 7380
 gccttggggtg ctacacctca tgaagttcat ggtgtgaggt ggcttcggca tctcaattaa 7440
 gtgacaaaga gaaaggtggt tcagtgtttc tattgcaaat ggcagaaact cgtgatgacg 7500
 aggggaccat gcatgggttc atttcttttc ttcttggtt ctttctttcc ttttatatat 7560
 gcaggttcat aatttaaaaa ttagactcgc tttcaatttc ttaatttctc attttcctct 7620
 tatattactg tactaatggt aaccacgtac acttattttt tttttagttt aattttgata 7680
 gattgtgttg atttaaacat attaataatt tcaaccaaata aaaaatcatt ttagtagata 7740
 cggcttttta aataattatt aaaaatatta actattttat ctaaattggca cattttaatt 7800
 aaaaaaaatc cgggtgttga agtggtttat taatttggtt tggcattatt aaagcaactt 7860
 tttttttatt tgttggcatt ttgagtacgt acttaggcta gcctgca 7907

<210> 66
 <211> 18661
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> pKR1192

<400> 66
 cgcgccagat cctctagagt cgacctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata 60
 gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag 120
 cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaagt agtgagctaa ctacattaa ttgcgttgcg 180
 ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca 240
 acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtatttg atcgatccct gaaagcgacg ttggatgtta 300
 acatctacaa attgcctttt cttatcgacc atgtacgtaa gcgcttacgt ttttggtgga 360
 cccttgagga aactggtagc tgttgtgggc ctgtggtctc aagatggatc attaatctcc 420
 accttcacct acgatggggg gcatcgcacc ggtgagtaat attgtacggc taagagcgaa 480
 tttggcctgt agacctcaat tgcgagcttt ctaatttcaa actattcggg cctaactttt 540
 ggtgtgatga tgctgactgg caggatatat accgttgtaa tttgagctcg tgtgaataag 600
 tcgctgtgta tgtttgtttg attgtttctg ttggagtga gcccatctca ccggacaagt 660
 cggctagatt gatttagccc tgatgaactg ccgaggggaa gccatcttga gcgcggaatg 720
 ggaatggatt tcgttgtaac acgagacgac agaacaccca cgggaccgag ctctcgcgagc 780
 ttttgtatcc gtggcatcct tgggtccgggc gatttggtca cgtccatgag gcgctctcca 840

aaggaacgca tattttccgg tgcaaccttt ccggttcttc ctctactcga cctcttgaag	900
tcccagcatg aatgttcgac cgctccgcaa gcgcatcttt ggcgcaacca gccggtttcg	960
cacgtcgatt ctgcgagacc tgcatacttt ggcaagattg ctgaatgacg ctgatgcttc	1020
atcgcaatct gcgataatgg ggtaagtatc cgggtgaaggc cgcaggtcag gccgcctgag	1080
cactcagtgt cttggatgtc cagttccacg gcagctgttg ctcaagcctg ctgatcggag	1140
cgtccgcaag gtcggcgcgg acgtcggcaa gccaggcctg cggatcgatg ttattgagct	1200
tggcgctcat gatcagtgtc gccatgaacg ccgcacgttc agcacaacga tccgatccgg	1260
caaacagcca tgacttctcg ccgagtacat agcctctgag cgttcgttcg gcagcattgt	1320
tcgtcaggca aatcggggcg tcatcgagga atgacgtaat gccatcccat cgcttgagca	1380
tgtaatttat cgctcggcg acgggagaac tgcgcgacaa tttccccgc tcggtttcga	1440
gccaatcatg cagctcttcg gcgagtgacc ttgatcaggc caccgccacg accgcggaag	1500
acgaacagat gcctgcgcat cggatcgcg ctcagcgtct cttgcaccat cagcgacaaa	1560
ccgggaaagc ctttgcgcat gtccgtactt atgtcgccac ttgggagggc ttcgtctacg	1620
tggccttcgt gatcgacgtc ttgcgccgtc gcattgtcgg atggcgggcg agccggacag	1680
cacatgcagg ctttgtctc gatgccctcg aggaggctca tcatgatcgg cgtcccgtc	1740
atggcggcct agtgcacac tcggatcgcg gtgttcaata cgtgtccttt cgctattccg	1800
agcggttggc agaagcaggt atcgagccat ctatcggaag cgtcggcgac agcacgacaa	1860
cgcctctgca gaagcgatca acggtcttta caaggccgag gtcattcatc ggcgtggacc	1920
atggaggagc ttcgaagcgg tcgagttcgc taccttggaa tggatagact ggttcaacca	1980
cggcggtttt tgaagcccat cggcaatata ccgccagccg aagacgagga tcagtattac	2040
gccatgctgg acgaagcagc catggctgcg cattttaacg aaatggcctc cggcaaacc	2100
ggtgcggttc acttgttgcg tgggaaagtt cacgggactc cgcgcacgag ccttcttcgt	2160
aatagccata tcgaccgaat tgacctgcag gggggggggg gaaagccacg ttgtgtctca	2220
aaatctctga tgttacattg cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc	2280
tgcttacata aacagtaata caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcttg	2340
ctcgaggccg cgattaaatt ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg	2400
cgataatgtc gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc	2460
agagttgttt ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt	2520

cagactaaac tggctgacgg aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac	2580
tcctgatgat gcatgggttac tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat tccaggtatt	2640
agaagaatat cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtggt tcctgcgccg	2700
gttgcatctcg attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcggtat ttcgtctcgc	2760
tcaggcgcaa tcacgaatga ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg	2820
taatggctgg cctgttgaac aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc cattctcacc	2880
ggattcagtc gtcactcatg gtgattttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa	2940
attaatatgtg tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc	3000
catcctatgg aactgcctcg gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa	3060
atatggtatt gataatcctg atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt	3120
tttctaataca gaattgggtta attgggttgta aactggcag agcattacgc tgacttgacg	3180
ggacggcggc tttgttgaat aaatcgaact tttgctgagt tgaaggatca gatcacgcat	3240
cttcccgcaca acgcagaccg ttccgtggca aagcaaaagt tcaaaatcac caactggtcc	3300
acctacaaca aagctctcat caaccgtggc tccctcactt tctggctgga tgatggggcg	3360
attcaggcct ggtatgagtc agcaacacct tcttcacgag gcagacctca ggcggggggc	3420
ccccctgcag gtcttttcca atgatgagca cttttaaaagt tctgctatgt ggcggcggtat	3480
tatcccggtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg	3540
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag	3600
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa	3660
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc	3720
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca	3780
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc	3840
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc	3900
tgcgctcggc ccttccggct ggctgggtta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg	3960
ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta	4020
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag	4080
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga	4140
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc	4200

tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa	4260
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia	4320
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc	4380
cgaaggtaac tggtctcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt	4440
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattcc	4500
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac	4560
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	4620
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg	4680
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag	4740
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt	4800
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat	4860
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc	4920
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	4980
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaag	5040
cgaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaacgca	5100
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc	5160
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgaacg	5220
gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg	5280
gagctgcatg tgtcagaggt ttccaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc aggggtgcctt	5340
gatgtgggcg ccggcggtcg agtggcgacg gcgcggcttg tccgcgccct ggtagattgc	5400
ctggccgtag gccagccatt tttgagcggc cagcggccgc gataggccga cgcgaagcgg	5460
cggggcgtag ggagcgcagc gaccgaaggg taggcgcttt ttgcagctct tcggctgtgc	5520
gctggccaga cagttatgca caggccaggc ggggtttaag agttttaata agttttaaag	5580
agtttttaggc ggaaaaatcg ccttttttct cttttatatc agtcacttac atgtgtgacc	5640
ggttcccaat gtacggcttt gggttcccaa tgtacgggtt ccggttccca atgtacggct	5700
ttgggttccc aatgtacgtg ctatccacag gaaagagacc ttttcgacct ttttcccctg	5760
ctagggcaat ttgccctagc atctgctccg tacattagga accggcggat gcttcgccct	5820
cgatcagggt gcggtagcgc atgactagga tcgggccagc ctgccccgcc tcctccttca	5880

aatcg tactc	cggcagg tca	tttgacccga	tcagcttgcg	cacggtgaaa	cagaacttct	5940
tgaactctcc	ggcgctgcca	ctgcgttcgt	agatcgtctt	gaacaaccat	ctggcttctg	6000
ccttgccctgc	ggcgcgggcgt	gccaggcggt	agagaaaaacg	gccgatgccg	ggatcgatca	6060
aaaagtaatc	ggggtgaacc	gtcagcacgt	ccgggttctt	gccttctgtg	atctcgcggt	6120
acatccaatc	agctagctcg	atctcgatgt	actccggccg	cccggtttcg	ctctttacga	6180
tcttgtagcg	gctaataaag	gcttcaccct	cggataccgt	caccaggcgg	ccgttcttgg	6240
ccttcttcgt	acgctgcatg	gcaacgtgcg	tggtgtttaa	ccgaatgcag	gtttctacca	6300
ggtcgtcttt	ctgctttccg	ccatcggtc	gccggcagaa	cttgagtacg	tccgcaacgt	6360
gtggacggaa	cacgcggccg	ggcttgtctc	ccttcccttc	ccggtatcgg	ttcatggatt	6420
cggttagatg	ggaaaccgcc	atcagtacca	ggtcgtaatc	ccacacactg	gccatgccgg	6480
ccggccctgc	ggaaacctct	acgtgcccg	ctggaagctc	gtagcggatc	acctcgccag	6540
ctcgtcggtc	acgcttcgac	agacggaaaa	cggccacgtc	catgatgctg	cgactatcgc	6600
gggtgcccac	gtcatagagc	atcggaacga	aaaaatctgg	ttgctcgtcg	cccttggggc	6660
gcttccta	cgacggcgca	ccggctgccg	gcggttgccg	ggattctttg	cggattcgat	6720
cagcggccgc	ttgccacgat	tcaccggggc	gtgcttctgc	ctcgatgcgt	tgcgcgtggg	6780
cggcctgcgc	ggccttcaac	ttctccacca	ggcatcacc	cagcgcgcgc	ccgatttgta	6840
ccgggccgga	tggtttgcga	ccgctcacgc	cgattcctcg	ggcttggggg	ttccagtgcc	6900
attgcagggc	cggcagacaa	cccagccgct	tacgcctggc	caaccgccc	ttcctccaca	6960
catggggcat	tccacggcgt	cggtgccctg	ttgttcttga	ttttccatgc	cgccctcttt	7020
agccgctaaa	attcatctac	tcattttatc	atttgctcat	ttactctggt	agctgcgcga	7080
tgtattcaga	tagcagctcg	gtaatggtct	tgccttggcg	taccgcgtac	atcttcagct	7140
tggtgtgatc	ctccgccggc	aactgaaagt	tgaccgcgtt	catggctggc	gtgtctgcca	7200
ggctggccaa	cgttgacagc	ttgctgctgc	gtgcgctcgg	acggccggca	cttagcgtgt	7260
ttgtgctttt	gtcatttttc	tctttacctc	attaactcaa	atgagttttg	atttaatttc	7320
agcggccagc	gcctggacct	cgcgggcagc	gtcgccctcg	ggttctgatt	caagaacgg	7380
tgtgccggcg	gcggcagtg	ctgggtagct	cacgcgctgc	gtgatacggg	actcaagaat	7440
gggcagctcg	taccgggcca	gcgcctcggc	aacctcaccg	ccgatgcgcg	tgcctttgat	7500
cgcgcgcgac	acgacaaagg	ccgcttgtag	ccttccatcc	gtgacctcaa	tgcgctgctt	7560

aaccagctcc accaggtcgg cggtaggcca tatgtcgtaa gggcttggct gcaccggaat	7620
cagcacgaag tcggctgcct tgatcgcgga cacagccaag tccgccgcct ggggcgctcc	7680
gtcgatcact acgaagtcgc gccggccgat ggccttcacg tcgcgggtcaa tcgtcgggcg	7740
gtcgatgccg acaacgggta gcggttgatc ttccgcacg gccgcccaat cgcgggcact	7800
gccctgggga tcggaatcga ctaacagaac atcggccccg gcgagttgca gggcgcgggc	7860
tagatgggtt gcgatggtcg tcttgccgta cccgcctttc tgggtaagta cagcgataac	7920
ttcatgcgtt cccttgcgta tttgtttatt tactcatcgc atcatatacg cagcgaccgc	7980
atgacgcaag ctgttttact caaatacaca tcaccttttt agacggcggc gctcgggttc	8040
ttcagcggcc aagctggccg gccaggccgc cagcttgga tcagacaaac cggccaggat	8100
ttcatgcagc cgcacgggtg agacgtgcgc gggcggtcgc aacacgtacc cggcccgcat	8160
catctccgcc tcgatctctt cggtaatgaa aaacggttcg tcctggccgt cctgggtcgg	8220
tttcatgctt gttcctcttg gcgttcattc tcggcgccgc ccagggcgtc ggccctcggtc	8280
aatgcgtcct cacggaaggc accgcgcgc ctggcctcgc tgggcgtcac ttccctcgtg	8340
cgctcaagtg cgcggtacag ggtcgagcga tgcacgcaa gcagtgcagc cgcctctttc	8400
acggtgcggc cttcctggtc gatcagctcg cgggcgtgcg cgatctgtgc cggggtgagg	8460
gtagggcggg ggccaaactt cagccctcgc gccttggcgc cctcgcgccc gctccgggtg	8520
cggtcgatga ttagggaacg ctogaactcg gcaatgccgc cgaacacggc caacaccatg	8580
cggccggccg gcgtgggtgt gtcggccac ggctctgcca ggctacgcag gcccgcgccg	8640
gcctcctgga tgcgctcggc aatgtccagt aggtcgcggg tgcgcgggc caggcggtct	8700
agcctggtca ctgtcacaac gtcgccaggc cgtagggtgt caagcatcct ggccagctcc	8760
gggcggtcgc gcctggtgcc ggtgatcttc tcggaaaaca gcttggtgca gccggccgcg	8820
tgcagttcgc cccgttggtt ggtcaagtcc tggctcgtcg tgctgacgcg ggcatagccc	8880
agcaggccag cggcggcgct cttgttcatt gcgtaatgtc tccggttcta gtcgcaagta	8940
ttctacttta tgcgactaaa acacgcgaca agaaaacgcc aggaaaaggc caggcgggca	9000
gcctgtcgcg taacttagga cttgtgcgac atgtcgtttt cagaagacgc ctgcactgaa	9060
cgtcagaagc cgactgcact atagcagcgc aggggttgga ccacaggacg ggtgtggtcg	9120
ccatgatcgc gtagtcgata gtggctccaa gtagcgaagc gagcaggact gggcggcggc	9180
caaagcggtc ggacagtgtc ccgagaacgc gtgcgcgatg aaattgcatc aacgcatata	9240

gcgctagcag cacgccatag tgactggcga tgctgtcgga atggacgata tcccgcaaga	9300
ggcccggcag taccggcata accaagccta tgcctacagc atccaggggtg acgggtgccga	9360
ggatgacgat gagcgcattg ttagatttca tacacgggtgc ctgactgcgt tagcaattta	9420
actgtgataa actaccgcat taaagctagc ttgcttggtc gttccgcgtg aacgtcggct	9480
cgattgtacc tgcgttcaaa tactttgcga tcgtgttgcg cgctgcccgt gtgcgtcggc	9540
tgatctcacg gatcgactgc ttctctcgca acgcatccg acggatgatg tttaaaagtc	9600
ccatgtggat cactcggttg ccccgctcgt caccgtgttg gggggaaggt gcacatggct	9660
cagttctcaa tggaaattat ctgcctaacc ggctcagttc tgcgtagaaa ccaacatgca	9720
agctccaccg ggtgcaaagc ggcagcggcg gcaggatata ttcaattgta aatggcttca	9780
tgtccgggaa atctacatgg atcagcaatg agtatgatgg tcaatatgga gaaaaagaaa	9840
gagtaattac caattttttt tcaattcaaa aatgtagatg tccgcagcgt tattataaaa	9900
tgaaagtaca ttttgataaa acgacaaatt acgatccgtc gtatttatag gcgaaagcaa	9960
taaacaaatt attctaattc ggaaatcttt atttcgacgt gtctacattc acgtccaaat	10020
gggggcttag atgagaaact tcacgatcga tgccttgatt tcgccattcc cagataccca	10080
tttcatcttc agattgggtct gagattatgc gaaaatatac actcatatac ataaatactg	10140
acagtttgag ctaccaattc agtgtagccc attacctcac ataattcact caaatgctag	10200
gcagtctgtc aactcggcgt caatttgctg gccactatac gatagttgcg caaattttca	10260
aagtctctggc ctaacatcac acctctgtcg gcggcgggtc ccatttggtga taaatccacc	10320
atatcgaatt aattcagact cctttgcccc agagatcaca atggacgact tcctctatct	10380
ctacgatcta gtcaggaagt tcgacggaga aggtgacgat accatgttca ccaactgataa	10440
tgagaagatt agccttttca atttcagaaa gaatgctaac ccacagatgg ttagagaggc	10500
ttacgcagca ggtctcatca agacgatcta cccgagcaat aatctccagg agatcaaata	10560
ccttcccaag aagggttaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca tcaagaacac	10620
agagaaagat atattttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga ttcaaggctt	10680
gcttcacaaa ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aaaaaggtag ttcccactga	10740
atcaaaggcc atggagtcaa agattcaaata agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac	10800
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa	10860
catgggtggag cagcacacgc ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga	10920

ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 10980
 ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 11040
 atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgggtcc 11100
 caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 11160
 ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 11220
 ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agaggacacg 11280
 ctgaaatcac cagtctccaa gcttgcgggg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 11340
 gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtatttc ggctatgact gggcacaaca 11400
 gacaatcggc tgctctgatg ccgcctgttt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 11460
 ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 11520
 atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcaggttg tcaactgaagc 11580
 ggggaaggac tggtctgtat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 11640
 tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggtgc atacgcttga 11700
 tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatcg atcgagcgag cacgtactcg 11760
 gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 11820
 agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccagc ggcgaggatc tcgtcgtgac 11880
 ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 11940
 cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga 12000
 tattgtgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgtcttt acggtatcgc 12060
 cgtccccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 12120
 actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat 12180
 tccaccgccg ctttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgcgggtg 12240
 atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccg atcgatccaa 12300
 cacttacgtt tgcaacgtcc aagagcaaat agaccacgaa cgccggaagg ttgccgcagc 12360
 gtgtggattg cgtctcaatt ctctcttgca ggaatgcaat gatgaatatg atactgacta 12420
 tgaaactttg agggaatact gcctagcacc gtcacctcat aacgtgcatc atgcatgccc 12480
 tgacaacatg gaacatcgct atttttctga agaattatgc tcgttggagg atgtcgcggc 12540
 aattgcagct attgccaaca tcgaactacc cctcacgcat gcattcatca atattattca 12600

tgcggggaaa ggcaagatta atccaactgg caaatcatcc agcgtgattg gtaacttcag 12660
 ttccagcgac ttgattcggt ttggtgctac ccacgttttc aataaggacg agatgggtgga 12720
 gtaaagaagg agtgcgtcga agcagatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga 12780
 ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag 12840
 catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttattttatga gatgggtttt tatgattaga 12900
 gtcccgcaat tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat 12960
 aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcgat caaacttcgg tactgtgtaa 13020
 tgacgatgag caatcgagag gctgactaac aaaaggtaca tcgcgatgga tcgatccatt 13080
 cgccattcag gctgcgcaac tggtgggaag ggcatcgggt gcgggcctct tcgctattac 13140
 gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt 13200
 cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcct gcagcccggg ggatccgccc 13260
 actcgaggcg cgccgtcgac ggatccgtac gagatccggc cgccagatc ctgcagcccg 13320
 ggggatcctc tagacgtacg tgaaggttaa acatggtgaa tatgttacca ctagctggga 13380
 tgcccattag atcaaaactg taaaattctc ccgtttccct tctattcaca tgtgagcccc 13440
 ctcccttttc tttctttctc aattttgatt gagttaaagt caccagcaat gcactactca 13500
 ccctccaaaa aattttctgt acaacttctc ggactatccc aaagctcctt ttcttgagat 13560
 ggatggtcct gtctcttgcc cttgatgtct tccttggtcg attttggtt cctctaattg 13620
 ctttcttgct aggaatcacc acctcactca tctatgttgt cgtagcttct gaaagtctca 13680
 tacatatcct tagtggtgca ctcatcttgt attgaagtga aaaagaatgt tggtctccta 13740
 tccaaatctc cattgaatct ctttctccca atgttggtccc atcggttggt cctcctctcc 13800
 aaccaattgt aagggtgtta acataaacat ggtacaatta agatttttca tttcattaag 13860
 aaaagattga gatttggtgt tctaaagttt caattagagt ttgatgatat tgaaacaacc 13920
 gtagaacaca ttaagtatta ctaacttata catagagcat tggaatttca ctttttattt 13980
 attctgtttc cgccaaaggc acatgactca agttatttta cacaagtaac aaaggcatct 14040
 aagcctaagt attcttattc agacttttca ttattacttt cattgatttg gtgcgaaatg 14100
 cggcogetta cgcttggtcg gccttgcca ccatgcgggc aaaggtgccc aggtagctga 14160
 tcaggatgcc cccccctcc agcattgggg ggctgcgata cggcaagttg tgcttcttgc 14220
 acaactgctc cactttgatg ctggccgccg tcaggttgtg ccggggcagc gtcggccaca 14280

ggtggtgctc gatttggttaa ttcagcccac cgaagaacca gtccgtgacg agtccccgct 14340
 ggacgttcat cgttttcgtga atctggccgg cgaaaaagcc gtggccgtcc cacaccgagt 14400
 cctggatctt ctccaggggg tagtggttca tgaacaccac gatggcgatg ccgaagcccc 14460
 caagcaactc ggacacgaaa aacaccatga gtccggtcaa gaagcttgge atataaaagt 14520
 agtagaaciaa cgccttcagg cccagtgga gggccaggcc cacgtctctt ttctcgtact 14580
 gcctgcggtg gtactgggtg ctgcatcct tcaggcccgt ggctgtgtgg atgctctgga 14640
 agcaccagat gaacctcagg agggcacaga tgaagaagaa gtagtattgc tggtagttga 14700
 tcatccgccg tgagaacggg ccggccctct ccacgtcctc cttggaccat gccagcagcg 14760
 gcaggttgtc aatgtcgggg tcgtggcctt gcacgttggg ggccggagtgg tgtgcattgt 14820
 gcctgtcctt ccaccaggtc acagagaacc cttgcaagac gttcccgaag agcaagccga 14880
 tggcgttgtt gatcgatcgg tccttgaaca gctgatggtg gcagatatcg tgcgacaacc 14940
 aaccattttg ttggaagtga atgccaaca cgattgcccc gacgaggtac cagtggcact 15000
 gggatcatcaa tagcaccgag aggacccga ggccagcgt actgagcgtc ttatatgagt 15060
 accacatcgg tgatgcgtcg aacattcctg ctgcatgag ctcatctcgg agcttgccga 15120
 aatcctcctg cgtttcgtct gagttgggtt tcggtggcgt aggcgtcagt ggagatgatg 15180
 gttccatgat aggcattcctt cttagtttac tcacagcatt ttcagagtgc ataaccataa 15240
 agacatcagt ggcattcacga ccgcggtagt tctcaatgat gtcagcacc cctggatgat 15300
 ggttcaacca ggcagacaca tcataggtga caccatcaac ggtcagcga agtgctggcc 15360
 ttttcacat ggtgcggccg cgtgatgac tgatgagtgt ttaaggacca atggagagaa 15420
 tgtttgagtt gtgaagcga gaacctgagg cgtgggttatt tatagggaag agaggaaagt 15480
 gaatgaggga cacgtcacag aagtagggtg ctgagcttga gacattcttc agtatgcatg 15540
 gctatggaag ccttgggtgc tacacctcat gaagttcatg gtgtgaggtg gcttcggcat 15600
 ctcaattaag tgacaaagag aaaggtgttt cagtgtttct attgcaaag gcagaaaactc 15660
 gtgatgacga ggggaccatg catggtttca tttcttttct tcctggattc tttctttcct 15720
 tttatatatg caggttcata atttaaaaat tagactcgct ttcaatttct taattttctca 15780
 ttttctctt atattactgt actaatgtta accacgtaca cttatttttt ttttagttta 15840
 attttgatag attgtgttga tttaaacata ttaatatatt caaccaaata aaaatcattt 15900
 tagtagatac ggctttttta ataattatta aaaatatata ctatttatcc taaatggcac 15960

attttaatta aaaaaaatcc ggtgttgtaa gtgttttatt aatttgtttt ggcattatta 16020
 aagcaacttt ttttttattt gttggcattt tgagtacgta cttaggctag cctgcaggag 16080
 atccaagctt ttgatccatg cccttcattt gccgcttatt aattaatttg gtaacagtcc 16140
 gtactaatca gttacttata cttcccccat cataattaat cttggtagtc tcgaatgcca 16200
 caacactgac tagtctcttg gatcataaga aaaagccaag gaacaaaaga agacaaaaca 16260
 caatgagagt atcctttgca tagcaatgct taagttcata aaattcaaac aaaaacgcaa 16320
 tcacacacag tggacatcac ttatccacta gctgatcagg atcgccgct caagaaaaaa 16380
 aaactggacc ccaaaagcca tgcacaacaa cacgtactca caaagggtgtc aatcgagcag 16440
 cccaaaacat tcaccaactc aaccatcat gagccctcac atttggtgtt tctaacccaa 16500
 cctcaaactc gtattctctt ccgccacctc atttttgttt atttcaacac ccgtcaaact 16560
 gcatgccacc ccgtggccaa atgtccatgc atgttaacaa gacctatgac tataaatagc 16620
 tgcaatctcg gccaggttt tcatcatcaa gaaccagttc aatatcctag tacaccgtat 16680
 taaagaattt aagatatact gcggccgcac catggaagca gccaaagaat tggtttccat 16740
 cgtccaagag gagtcccca aggtggacta tgcccagctt tggcaggatg ccagcagctg 16800
 tgaggctcctt tacctctcgg tggcattcgt ggcgatcaag ttcattgctgc gcccaactga 16860
 cctgaagcgc caggccacct tgaagaagct gttcacagca tacaacttcc tcatgtogat 16920
 ctattccttt ggctccttcc tggccatggc ctatgcccta tcagtaactg gcatcctctc 16980
 cggcgactgt gagacggcgt tcaacaacga tgtgttcagg atcacaactc agctgttcta 17040
 cctcagcaag ttctagagt acatogactc cttctacctt ccccttatgg acaagccact 17100
 gtctgtcctt cagttcttcc atcatttggg ggccccatt gacatgtggc tattctacaa 17160
 ataccgcaac gaaggagtct ggatctttgt cctgttgaat gggttcattc actggatcat 17220
 gtacggttac tattggacgc ggctcatcaa gctgaacttc cccatgcca agaacctgat 17280
 cacctccatg cagatcatcc agttcaatgt cgggttctac atcgtctgga agtaccgcaa 17340
 tgtgccatgc taccgccagg atgggatgag catgtttgcc tggatcttca actactggta 17400
 tgtcgggacg gtcttgctgc tgttcctcaa cttttacgtg cagacgtaca tccggaagcc 17460
 gaggaagaac cgagggaaga aggagtagcg gccgcaagta tgaactaaaa tgcattgtagg 17520
 tgtaagagct catggagagc atggaatatt gtatccgacc atgtaacagt ataataactg 17580
 agtccatct cacttcttct atgaataaac aaaggatgtt atgatattt aacactctat 17640

ctatgcacct tattgttcta tgataaattt cctcttatta ttataaatca tctgaatcgt 17700
gacggcttat ggaatgcttc aaatagtaca aaaacaaatg tgtactataa gactttctaa 17760
acaattctaa ccttagcatt gtgaacgaga cataagtgtt aagaagacat aacaattata 17820
atggaagaag tttgtctcca tttatatatt atatattacc cacttatgta ttatattagg 17880
atgttaagga gacataacaa ttataaagag agaagtttgt atccatttat atattatata 17940
ctacccattt atatattata cttatccact tatttaaatgt ctttataagg tttgatccat 18000
gatatttcta atattttagt tgatatgtat atgaaagggg actatttgaa ctctcttact 18060
ctgtataaag gttggatcat ccttaaagtg ggtctattta attttattgc ttcttacaga 18120
taaaaaaaaa attatgagtt ggtttgataa aatattgaag gatttaaaat aataataaat 18180
aacatataat atatgtatat aaatttatta taatataaca tttatctata aaaaagtaaa 18240
tattgtcata aatctataca atcgtttagc cttgctggac gaatctcaat tatttaaacg 18300
agagtaaaca ttttgactt tttggttatt taacaaatta ttatttaaca ctatatgaaa 18360
tttttttttt tatcagcaaa gaataaaatt aaattaagaa ggacaatggg gtcccaatcc 18420
ttatacaacc aacttcaca agaaagtcaa gtcagagaca acaaaaaaac aagcaaagga 18480
aattttttta tttgagttgt cttgtttgct gcataattta tgcagtaaaa cactacacat 18540
aaccctttta gcagtagagc aatgggtgac cgtgtgctta gcttctttta ttttattttt 18600
ttatcagcaa agaataaata aaataaaatg agacacttca gggatgtttc aacaagcttg 18660
g 18661

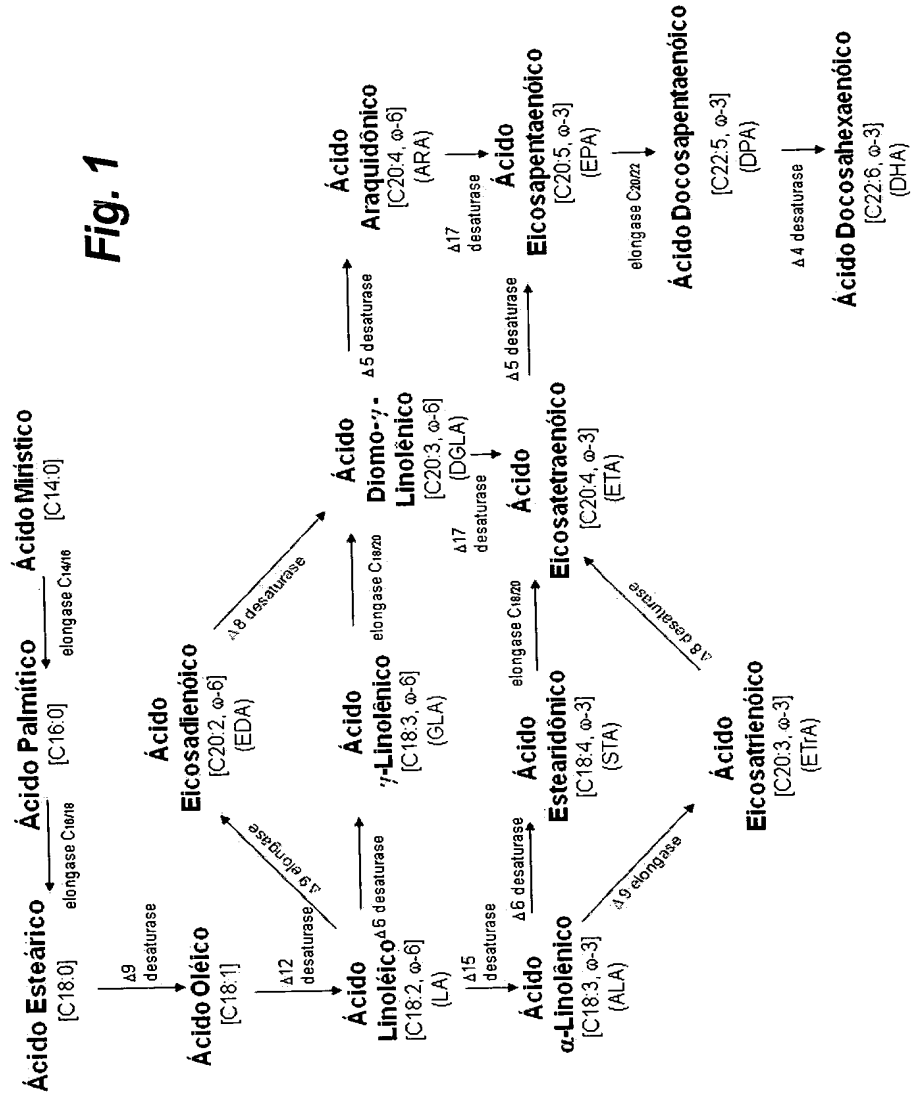
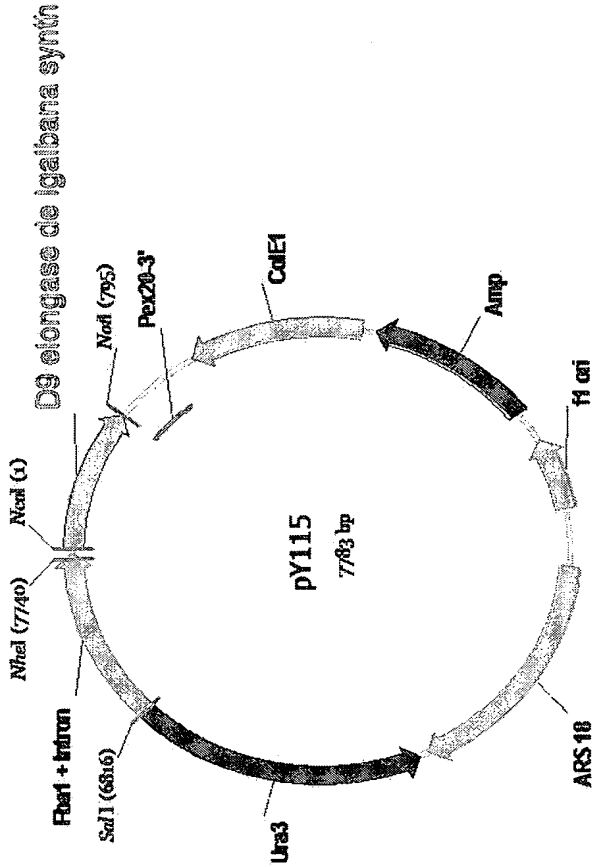


Fig. 2



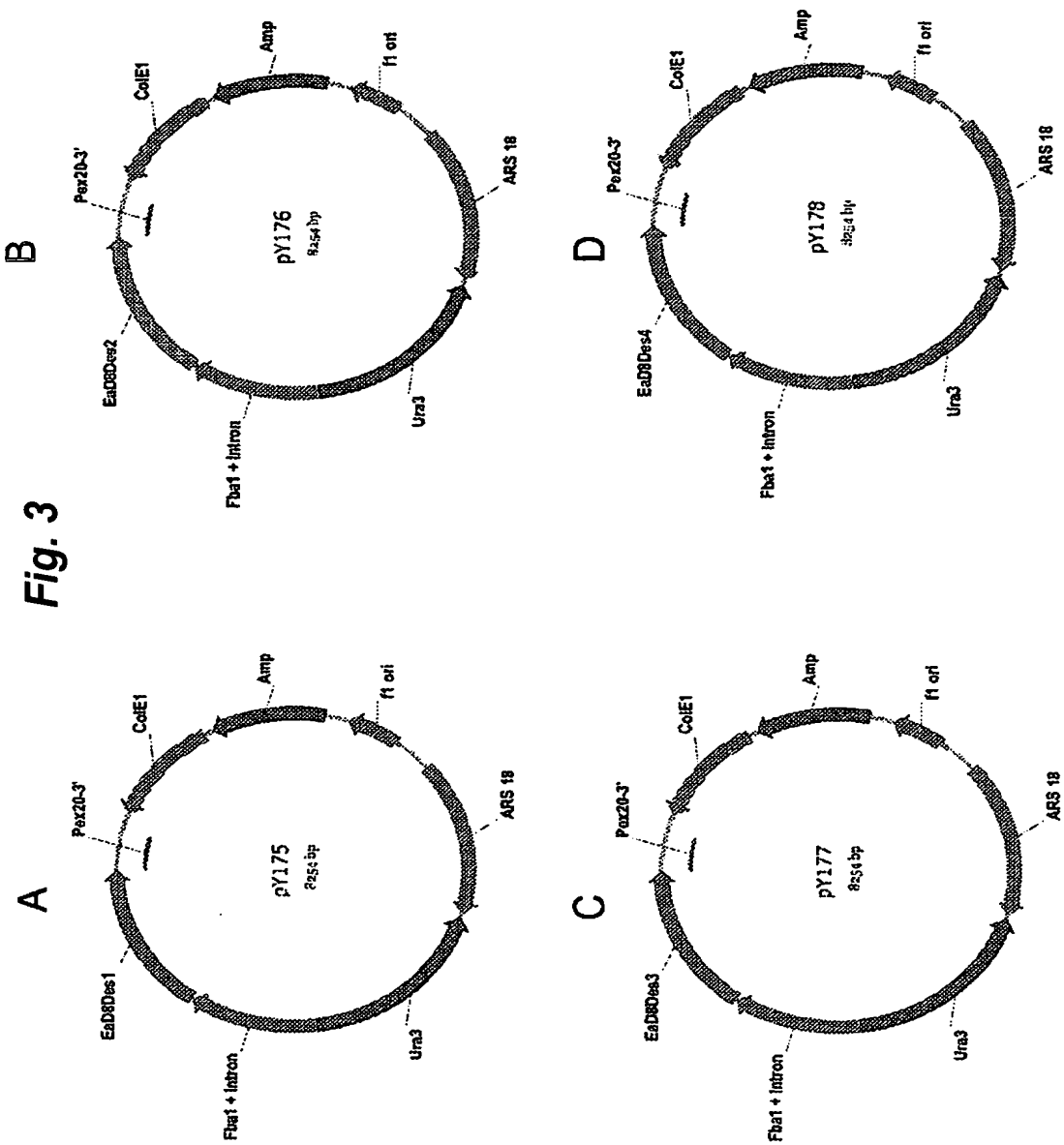
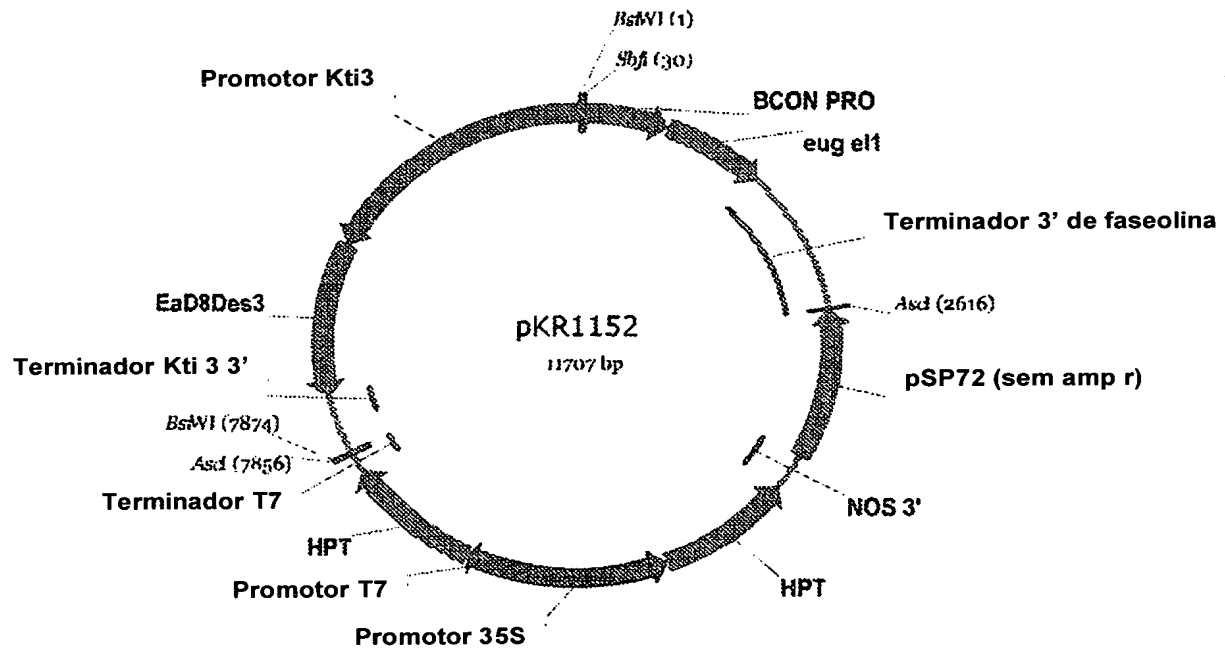


Fig. 4

Composição de ácidos Graxos (% em peso)															C20% de delta-8 desastu- rase	Ave. C20% de delta-8 desastu- rase	Razão (EDA/ERA) % desat.
Evento	Ácido graxo	16:0	16:1	18:0	18:1	LA	ALA	20:1	EDA	DGLA	ERA	ETA	24:0	24:1			
pY175-1	EDA	13.1	10.0	1.2	20.4	50.8	0.1	0.2	1.5	1.8	0.0	0.0	0.2	1.0	51.4	52.2	1.2
Y175-2	EDA	13.6	9.8	1.2	21.0	50.7	0.1	0.1	1.3	1.5	0.0	0.0	0.3	0.5	52.6		
Y175-2	EDA	13.5	9.7	1.2	21.1	50.8	0.1	0.2	1.3	1.4	0.0	0.0	0.2	0.4	52.8		
Y176-1	EDA	13.6	9.5	1.1	18.3	52.6	0.1	0.1	1.8	1.8	0.0	0.0	0.2	0.9	50.7	52.2	1.2
Y176-2	EDA	13.3	10.6	1.1	20.7	50.8	0.1	0.1	1.1	1.3	0.0	0.0	0.2	0.6	53.0		
Y176-3	EDA	13.2	10.6	1.1	21.1	50.5	0.1	0.1	1.1	1.3	0.0	0.0	0.2	0.7	53.0		
Y177-1	EDA	13.3	10.3	1.1	19.2	52.3	0.1	0.1	1.4	1.6	0.0	0.0	0.1	0.3	52.6	52.3	1.1
Y177-2	EDA	13.3	10.1	1.2	21.5	50.4	0.1	0.1	1.2	1.3	0.0	0.0	0.2	0.6	52.7		
Y177-3	EDA	13.3	10.2	1.1	22.6	49.7	0.1	0.1	1.2	1.2	0.0	0.0	0.2	0.2	51.5		
Y178-1	EDA	13.5	9.6	1.2	21.8	50.5	0.1	0.2	1.4	1.3	0.0	0.0	0.1	0.3	47.5	49.2	1.1
Y178-2	EDA	13.7	9.2	1.2	19.5	51.9	0.1	0.2	1.9	1.8	0.0	0.0	0.1	0.3	48.4		
Y178-3	EDA	13.6	9.8	1.2	22.2	49.8	0.1	0.2	1.3	1.4	0.0	0.0	0.1	0.3	51.5		
Y175-1	ERA	12.2	8.8	1.3	21.9	40.8	7.2	0.1	0.1	0.1	3.8	3.1	0.1	0.5	44.3	44.3	
Y175-2	ERA	12.1	9.2	1.3	21.4	40.9	7.2	0.1	0.1	0.1	3.9	3.1	0.1	0.4	44.1		
Y175-3	ERA	12.1	9.1	1.2	21.2	41.1	7.3	0.1	0.1	0.1	3.9	3.2	0.1	0.3	44.5		
Y176-1	ERA	12.1	8.8	1.2	20.1	41.1	8.1	0.1	0.1	0.1	4.3	3.3	0.1	0.5	43.6	44.7	
Y176-2	ERA	12.3	9.6	1.3	23.0	40.5	6.3	0.1	0.1	0.1	3.3	2.7	0.2	0.3	45.2		
Y176-3	ERA	12.0	9.6	1.3	21.0	41.3	7.4	0.1	0.1	0.1	3.7	3.0	0.0	0.4	45.3		
Y177-1	ERA	12.1	9.5	1.2	22.4	40.4	7.1	0.1	0.1	0.1	3.5	3.0	0.1	0.3	45.7	45.5	
Y177-2	ERA	12.0	9.9	1.2	21.3	40.3	7.6	0.1	0.1	0.1	3.8	3.0	0.1	0.6	45.1		
Y177-3	ERA	12.0	9.8	1.2	20.1	40.6	7.7	0.1	0.1	0.1	3.8	3.2	0.1	1.0	45.9		
Y178-1	ERA	11.7	9.8	1.0	19.5	42.8	8.3	0.1	0.1	0.1	3.7	2.7	0.1	0.4	42.3	44.1	
Y178-2	ERA	12.0	9.8	1.2	20.8	40.9	7.8	0.1	0.1	0.1	3.7	3.0	0.1	0.3	44.6		
Y178-3	ERA	12.2	10.2	1.2	24.4	40.4	5.6	0.1	0.1	0.1	2.8	2.3	0.2	0.4	45.5		

**Fig. 5**

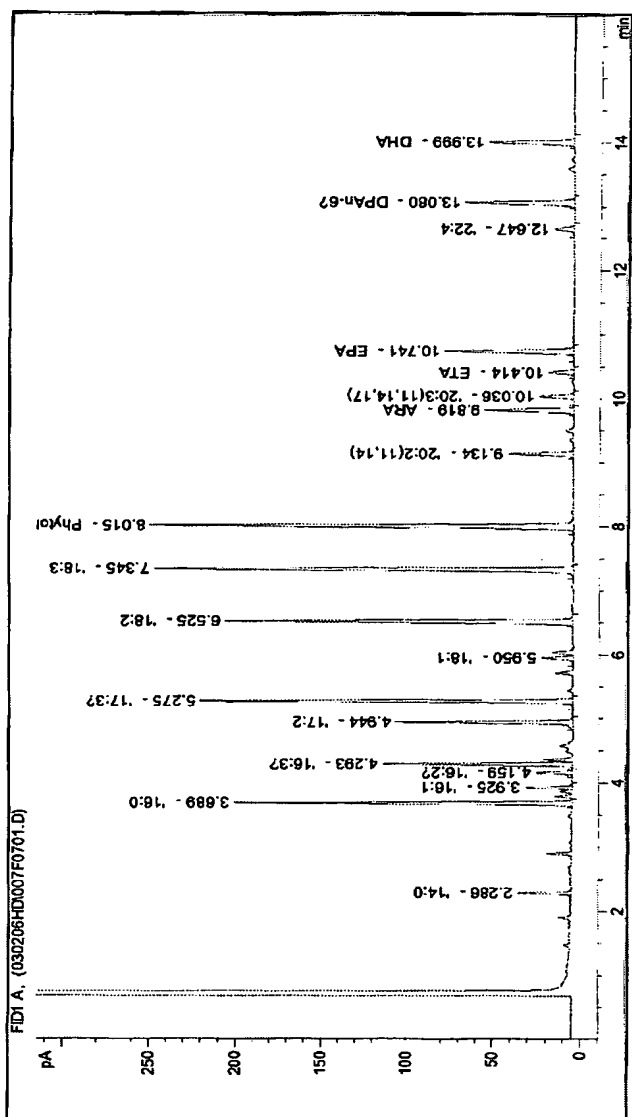


Fig. 6

Fig. 7A

		Consenso #1				
		M..KR.ALPLT.DG.TYDVSAN.N.HPGGA.IIENY.GRDATA.D.FVMVMS				
		10	20	30	40	50
1	M-VKRPALPLTV	DGVTYDVS	SAWLNHH	PGGADI	IENYGRDA	TDVFMVMS
	Ead8Des1	(SEQ ID NO21)	.pro			
1	M-VKRPALPLTV	DGVTYDVS	SAWLNHH	PGGADI	IENYGRDA	TDVFMVMS
	Ead8Des2	(SEQ ID NO22)	.pro			
1	M-VKRPALPLTV	DGVTYDVS	SAWLNHH	PGGADI	IENYGRDA	TDVFMVMS
	Ead8Des3	(SEQ ID NO23)	.pro			
1	M-VKRPALPLTV	DGVTYDVS	SAWLNHH	PGGADI	IENYGRDA	TDVFMVMS
	Ead8Des4	(SEQ ID NO24)	.pro			
1	MKSKRQALPLT	IDGTTYDVS	AWVNEH	PGGAEL	IENYQGRDA	TDVFMVMS
	EgD8 corrigida	(SEQ ID NO25)	.pro			
		..A..KL.RMP...PSS.L...PP.....E.QEDFRKLR.ELIA.GMFDA				
		60	70	80	90	100
50	ENAVSKLRRMP	IMEPSSPLT	PTPPKPN	SDPEQED	FRKLRDEL	IAAGMFDA
	Ead8Des1	(SEQ ID NO21)	.pro			
50	ENAVSKLRRMP	IMEPSSPLT	PTPPKPN	SDPEQED	FRKLRDEL	IAAGMFDA
	Ead8Des2	(SEQ ID NO22)	.pro			
50	ENAVSKLRRMP	IMEPSSPLT	PTPPKPN	SDPEQED	FRKLRDEL	IAAGMFDA
	Ead8Des3	(SEQ ID NO23)	.pro			
50	ENAVSKLRRMP	IMEPSSPLT	PTPPKPN	SDPEQED	FRKLRDEL	IAAGMFDA
	Ead8Des4	(SEQ ID NO24)	.pro			
51	QEAFDKLRMP	KINPSEL---	PPQAAV	NEAQED	FRKLREEL	IATGMFDA
	EgD8 corrigida	(SEQ ID NO25)	.pro			
		SP.WY.YK...TLGLGVL...LM.Q...Y..GA..LG.H.QQMGWLSHDI				
		110	120	130	140	150
100	SPMWYAYKT	LTTLGLGVL	AVLLMTQ	WHYLVGA	IVLGIHFQ	QMGWLSHDI
	Ead8Des1	(SEQ ID NO21)	.pro			
100	SPMWYAYKT	LTTLGLGVL	AVLLMTQ	WHYLVGA	IVLGIHFQ	QMGWLSHDI
	Ead8Des2	(SEQ ID NO22)	.pro			
100	SPMWYAYKT	LTTLGLGVL	AVLLMTQ	WHYLVGA	IVLGIHFQ	QMGWLSHDI
	Ead8Des3	(SEQ ID NO23)	.pro			
100	SPMWYAYKT	LTTLGLGVL	AVLLMTQ	WHYLVGA	IVLGIHFQ	QMGWLSHDI
	Ead8Des4	(SEQ ID NO24)	.pro			
98	SPLWYSYK	ISTTLGLG	VLYFLM	VQYQMY	FIGAVLLG	MHYQQMGWLSHDI
	EgD8 corrigida	(SEQ ID NO25)	.pro			

Fig. 7B

CHHQ.FK.R..NN..GL.FGN.LQGF	SVTWKDRHNAHHSATNVQGHDPD	Consenso #1		
160	170	180	190	200
150	CHHQLFKDRSINNAIGLLFGNV	LQGF	SVTWKDRHNAHHSATNVQGHDPD	EaD8Des1 (SEQ ID NO21).pro
150	CHHQLFKDRSINNAIGLLFGNV	LQGF	SVTWKDRHNAHHSATNVQGHDPD	EaD8Des2 (SEQ ID NO22).pro
150	CHHQLFKDRSINNAIGLLFGNV	LQGF	SVTWKDRHNAHHSATNVQGHDPD	EaD8Des3 (SEQ ID NO23).pro
150	CHHQLFKDRSINNAIGLLFGNV	LQGF	SVTWKDRHNAHHSATNVQGHDPD	EaD8Des4 (SEQ ID NO24).pro
148	CHHQTCKNRNWNVLVGLVFGN	LQGF	SVTWKDRHNAHHSATNVQGHDPD	(SEQ ID NO25).pro
				EgD8 corrigida
IDNLP	LLAWS..DV.RA.P.SR..I..QYYF..IC.LLRFI	WCFQS..T	Consenso #1	
210	220	230	240	250
200	IDNLP	LLAWSKEDVERAGPF	SRRIKYQYYFF	ICALLRFIWCFSQSIHT
200	IDNLP	LLAWSKEDVERAGPF	SRRIKYQYYFF	ICALLRFIWCFSQSIHT
200	IDNLP	LLAWSKEDVERAGPF	SRRIKYQYYFF	ICALLRFIWCFSQSIHT
200	IDNLP	LLAWSKEDVERAGPF	SRRIKYQYYFF	ICALLRFIWCFSQSIHT
198	IDNLP	LLAWSEDDVTRASPI	SRKLIQFQYYFLVICILLRFIWCFSQSVLT	(SEQ ID NO25).pro
				EgD8 corrigida
...LKDR.NQ.YR.QY.KE..GLAHW.LK.LF..F.MPS.LT.L.VFFV	Consenso #1			
260	270	280	290	300
250	AKGLKDRSNQYRRQY	KEKESVGLAHWGLKALFYFYF	MPFSFLTGLMVFFV	EaD8Des1 (SEQ ID NO21).pro
250	ATGLKDRSNQYRRQY	KEKESVGLAHWGLKALFYFYF	MPFSFLTGLMVFFV	EaD8Des2 (SEQ ID NO22).pro
250	ATGLKDRSNQYRRQY	KEKESVGLAHWGLKALFYFYF	MPFSFLTGLMVFFV	EaD8Des3 (SEQ ID NO23).pro
250	AKGLKDRSNQYRRQY	KEKESVGLAHWGLKALFYFYF	MPFSFLTGLMVFFV	EaD8Des4 (SEQ ID NO24).pro
248	VRSLKDRDNQFYRSQY	KKKAIGLALHWT	LT	KTFLFFMP
				SILTSILVFFV
				(SEQ ID NO25).pro
				EgD8 corrigida

Fig. 7C

SEL.GGFGGIAIVVFMNHYPLEKI.DSVWDGHGF..GQIHETMN..RG..T		Consenso #1
	310 320 330 340 350	
300	SELLGGFGGIAIVVFMNHYPLEKIQDSVWDGHGFCAGQIHETMNVQRLVT	EaD8Des1 (SEQ ID NO21).pro
300	SELLGGFGGIAIVVFMNHYPLEKIQDSVWDGHGFCAGQIHETMNVQRLVT	EaD8Des2 (SEQ ID NO22).pro
300	SELLGGFGGIAIVVFMNHYPLEKIQDSVWDGHGFCAGQIHETMNVQRLVT	EaD8Des3 (SEQ ID NO23).pro
300	SELLGGFGGIAIVVFMNHYPLEKIQDSVWDGHGFCAGQIHETMNVQRLVT	EaD8Des4 (SEQ ID NO24).pro
298	SELVGGFGGIAIVVFMNHYPLEKIGDSVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGIT	EgD8 corrigida (SEQ ID NO25).pro
DWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTA.S..VEQLC.KHNLPLYR.P...EG		Consenso #1
	360 370 380 390 400	
350	DWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTAASIKVEQLCKKHNLPLYRSPPMLEG	EaD8Des1 (SEQ ID NO21).pro
350	DWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTAASIKVEQLCKKHNLPLYRSPPMLEG	EaD8Des2 (SEQ ID NO22).pro
350	DWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTAASIKVEQLCKKHNLPLYRSPPMLEG	EaD8Des3 (SEQ ID NO23).pro
350	DWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTAASIKVEQLCKKHNLPLYRSPPMLEG	EaD8Des4 (SEQ ID NO24).pro
348	DWFFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNLTAVSQVEQLCQKHNLPLYRNPLPHEG	EgD8 corrigida (SEQ ID NO25).pro
..IL..YL..FARM..K..A.KA.		Consenso #1
	410 420	
400	VGILISYLGTFARMVAK--ADKA	EaD8Des1 (SEQ ID NO21).pro
400	VGILISYLGTFARMVAK--ADKA	EaD8Des2 (SEQ ID NO22).pro
400	VGILISYLGTFARMVAK--ADKA	EaD8Des3 (SEQ ID NO23).pro
400	VGILISYLGTFARMVAK--ADKA	EaD8Des4 (SEQ ID NO24).pro
398	LVILLRYLAVFARMAEKQFAGKAL	EgD8 corrigida (SEQ ID NO25).pro

Fig. 8

Porcentagem de divergência

Porcentagem de identidade						
	1	2	3	4	5	
1		99.3	99.5	99.8	72.1	1
2	0.7		99.8	99.5	71.9	2
3	0.5	0.2		99.8	71.9	3
4	0.2	0.5	0.2		71.9	4
5	31.4	31.8	31.8	31.8		5
	1	2	3	4	5	

EgD8 corrigida (SEQ ID NO21).pro
 EgD8 corrigida (SEQ ID NO22).pro
 EgD8 corrigida (SEQ ID NO23).pro
 EgD8 corrigida (SEQ ID NO24).pro
 EgD8 corrigida (SEQ ID NO25).pro

Fig. 9A

1	ATGGTGAAAGGGCCAGCACTTCCGCTGACCGTTGATGGTGTCACTATGA	EaD8Des3
1	ATGGTCAAGCGAACCGCTCTGCCTCTCACCGTGGACGGTGTCACTACGA	EaD8S
51	TGTGTCTGCCTGGTTGAACCATCATCCAGGGGGTGGTGAACATCATTTGAGAA	EaD8Des3
51	CGTTTCTGCCTGGCTCAACCAACCATCCCGGAAGGTGCCGACATTATCGAGA	EaD8S
101	ACTACCGCGGTCTGTGATGCCACTGATGTCTTTATGGTTATGCACTCTGA	EaD8Des3
101	ACTACCGAGGTCCGGATGCTACCGACGTCTTCATGGTTATGCACTCCGAG	EaD8S
151	AATGCTGTGAAGTAAACTAAGAAAGGATGCCATATCATGGAACCATCATCTCC	EaD8Des3
151	AAAGCCCGTGTCCAAACTCAGACGAATGCCCATATCATGGAACCTTCCTCTCC	EaD8S
201	ACTGACGCCTACGCCACCGAAACCCAACTCAAGACGAACCGCAGGAGGATT	EaD8Des3
201	CCTGACTCCAAACCTCCCAAGCCAACCTCCGACGAACCTCAGGAGGATT	EaD8S
251	TCCGCAAGCTCCGAGATGAGCTCATCGGAGCAGGAATGTTCCGACGCATCA	EaD8Des3
251	TCCGAAGAGCTGCCAGACGAGCTCATTGCTGCAGGCATGTTCCGATGCCCTCT	EaD8S
301	CCGATGTGGTACGCATATAAGACGCTCAGTACGCTGGGCCTCGGGGTCTCT	EaD8Des3
301	CCCATATGTGGTACGCTTACCAAGACCTGTCTCGACTCTCGGACTGGGTCTCT	EaD8S
351	CGCGGTGCTATTGATGACCCAGTGGCACTGGTACCTCGTCTGGGGCAATACG	EaD8Des3
351	TGCCTGTGCTGTTGATGACCCAGTGGCACTGGTACCTGGTGGTGGTATCG	EaD8S
401	TGTTGGGCATTCACTTCCAAACAATAGGGTTGCTTGTCCGACGATATCTGC	EaD8Des3
401	TCCCTCGGCATTCACTTTCAACAGATGGGATGGCTCTCCGCACGAATTGCG	EaD8S
451	CACCATCAGCTGTTCAAGGACCGATCGATCAACAAAGCCATCGGCTTGCT	EaD8Des3
451	CATCAACAGCTGTTCAAGGACCGATCATCAACAATGCCATTGGCTTGCT	EaD8S
501	TTTCGGGAACGTCTTGCAAGGGTTCTCTGTGACCTGGTGGAAAGGACAAGGC	EaD8Des3
501	CTTCGGAAACGTCTTCAAGGCCTTTCTGTCTCACTTGGTGGAAAGGACCGAC	EaD8S
551	ACCAATGCACACCACTCCGCCACCAACGTGCAAGGTCAAGATCCCGACATT	EaD8Des3
551	ACAAACGCTCATCACTCCGCCACCAACGTGCAAGGTCAAGATCCCGACATT	EaD8S
601	GACAACTTGCCGCTGCTGGCATGGTCCAAGGAGGACGTGGAGAGGGCCGG	EaD8Des3
601	GACAACTGCTCTCTCTGGCTGGTCCAAGGAGGACGTGGAGGAGGCTGG	EaD8S

Fig. 9B

651	C C G G T T C T C A C G G C G G A T G A T C A A G T A C C A G C A A T C T A C T A C T T C T T C A	EaD8Des3
651	C C G G T T T T C T C G A C G G A T G A T C A A G T A C C A A C A G T A T T A C T T C T T T T C A	EaD8S
701	T T G T G T G C C C T C T G A A G T T C A T C T G G T G C T T C C A G A G C A T C C A C A A G C C	EaD8Des3
701	T C T G T G C C C T T C T G C G A T T C A T C T G G T G C T T T C A G T C C A T T C A T A C T G C C	EaD8S
751	A C G G G C C T C A A G G A T C G C A G C A A C C A G T A C T A C C G C A A G G C A G T A C G A G A A	EaD8Des3
751	A C G G G T C T C A A G G A T C G A A G C A A T C A G T A C T A T C G A A G A C A G T A C G A G A A	EaD8S
801	A G A G A G C G T G G G C T G G C C C T C C A C T G G G G C T C G A A G G C T T G T T T C T A C T	EaD8Des3
801	G G A G T C C G T C G G T C T G G C A C T C C A C T G G G G T C T C A A G G C C T T G T T C T A C T	EaD8S
851	A C T T T T A T A T G C C A A G C T T C T T G A C C G G A C T C A T G G T G T T T T C G T G T C C	EaD8Des3
851	A T T T C T A C A T G C C C T C G T T T C T C A C C G G A C T C A T G G T G T T C T T T G T C T C C	EaD8S
901	G A G C T T G C T T G G G G G C T T C G G C A T C G C C A T C G T G T G T T T C A T G A A C C A C T A	EaD8Des3
901	G A G C T T G C T T G G T G G C T T C G G A A T T G C C A T C G T T G T C T T C A T G A A C C A C T A	EaD8S
951	C C C C T G G A G A A G A T C C A G G A C T C G B T G T G G G A C G G C C A C G G C T T T T G C G	EaD8Des3
951	C C C T C T G G A G A A G A T T C A G G A C T C C G T G T G G G A T G G T C A T G G C T T C T G T G	EaD8S
1001	C C G G C C A G A T T C A C G A A A C G A T G A A C G T C C A G C G G G C A C T C G T C A C A G A C	EaD8Des3
1001	C T G G A C C A G A T T C A C G A G A C C A T G A A C G T T C A G C G A G C C T C G T C A C A G A C	EaD8S
1051	T G G T T C T T C G G T G G G C T G A A T T A C C A A A T C G A G C A C F A C C T G T G G C C G A C	EaD8Des3
1051	T G G T T T T T C G G T G G C C T C A A C T A C C A G A T C G A A C A T C A C C T G T G G C C T A C	EaD8S
1101	G C T G C C C C G G C A C A A C C T G A C G G C G G C A G C A T C A A A G T G G A G C A G T T G T	EaD8Des3
1101	T C T T C C C A G A C A C A A C C T C A C G G C T G C C T C C A T C A A A G T G G A G C A G C T G T	EaD8S
1151	G C A A G A A G C A C A A C T T C C G T A T C G C A C T C C C C A A T G C T G G A G G G G G T G	EaD8Des3
1151	G C A A G A A G C A C A A C C T G C C C T A C G G A T C T C C C C A T G C T C G A A G G T G T C	EaD8S
1201	G G C A T C C T G A T C A G C T A C C T G G G C A C T T T T G C C C G C A T G G T G G C A A A G G C	EaD8Des3
1201	G G C A T T C T T A T C T C C T A C C T G G G C A C C T T C G C T C G A A T G G T T G C C A A G G C	EaD8S
1251	C G C A A G G C G	EaD8Des3
1251	A G A C A A G G C C	EaD8S

EaD8Des3 (SEQ ID NO:19) e EaD8S (SEQ ID NO:48)

EaD8Des3(SEQ ID NO:19) e EaD8S(SEQ ID NO:48)

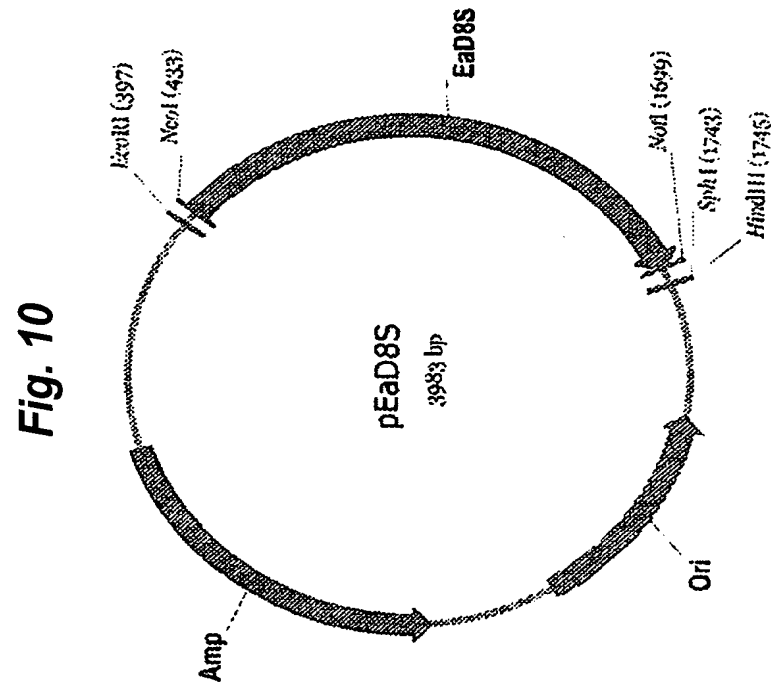


Fig. 11

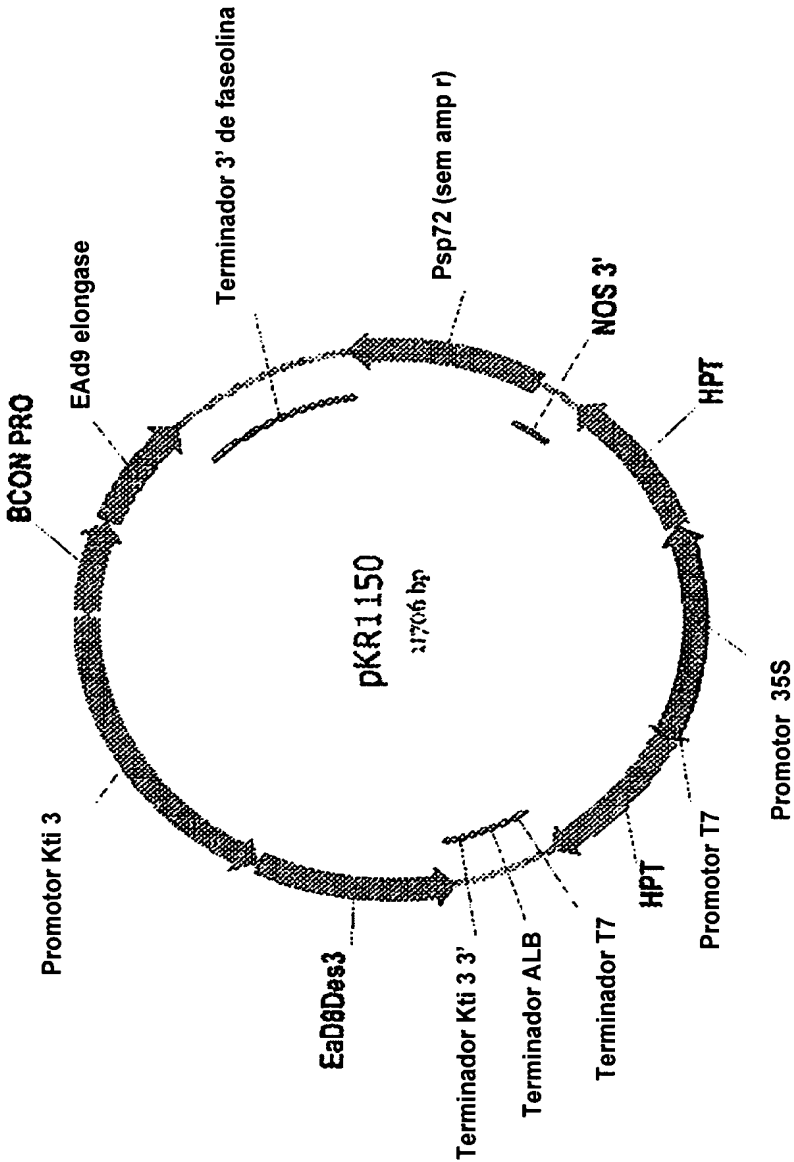


Fig. 12

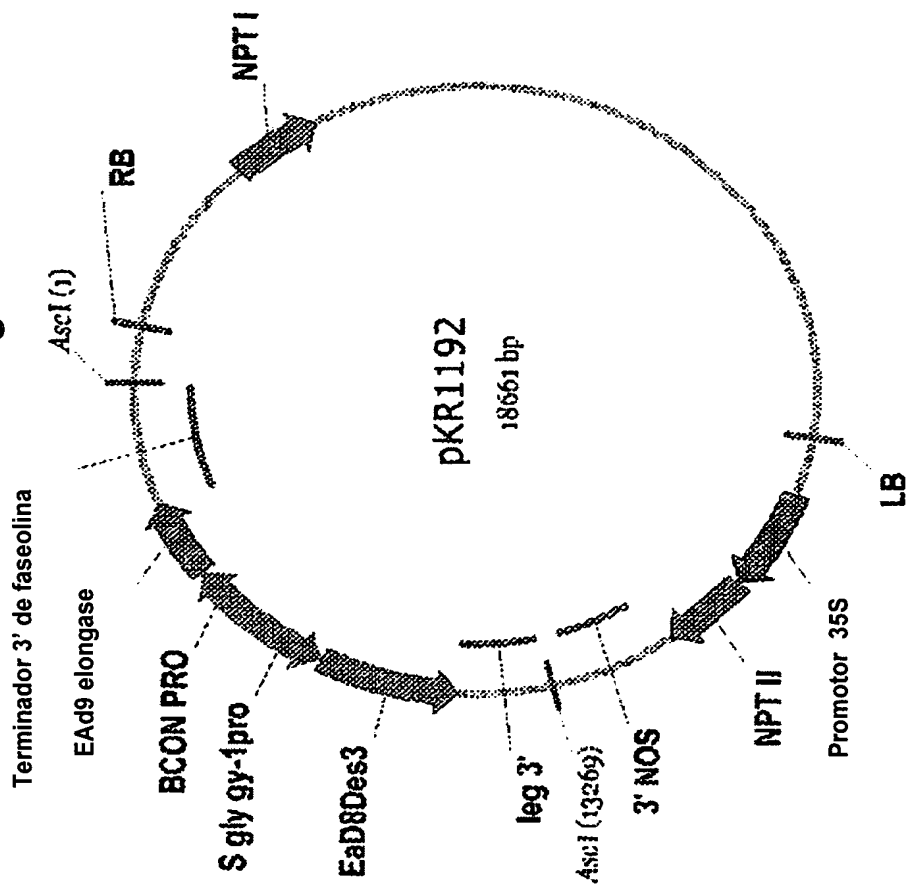


Fig. 13

Evento	Composição de ácidos Graxos (% em peso)									C18% de delta-9 elongase	C20% de delta-8 desaturase
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2136-1-3-1	17.7	4.2	12.0	30.3	12.0	8.8	10.2	1.0	3.1	35.3	57.8
2136-1-3-2	17.7	3.6	11.3	25.9	9.3	10.7	15.4	1.3	4.4	47.4	62.2
2136-1-3-3	17.8	3.8	9.1	25.2	9.3	10.3	17.4	1.3	5.0	49.6	65.9
2136-1-3-4	18.9	4.5	8.2	32.3	20.6	3.4	7.5	0.7	2.1	20.6	70.2
2136-1-3-5	17.9	4.0	14.4	27.1	10.5	8.4	12.5	0.9	3.8	40.5	63.6
Avg.	18.0	4.0	11.0	28.2	12.3	8.3	12.6	1.0	3.7	38.7	64.0
2136-2-8-1	17.0	3.8	12.1	25.7	9.7	11.6	13.9	1.3	4.5	46.9	58.8
2136-2-8-2	17.1	4.0	9.7	22.6	7.5	11.4	22.3	1.0	4.4	56.5	68.3
2136-2-8-3	18.3	3.6	9.0	25.9	10.9	10.6	14.8	1.5	4.7	46.2	61.7
2136-2-8-4	18.5	3.5	9.3	25.1	11.6	9.7	15.2	1.5	4.9	46.0	64.2
2136-2-8-5	18.8	3.9	11.0	24.6	12.4	8.4	13.8	1.3	4.8	43.3	65.8
Avg.	17.9	3.8	10.2	24.8	10.4	10.3	16.0	1.3	4.7	47.8	63.8
2136-2-15-1	16.7	3.0	14.7	28.9	9.6	8.9	12.9	0.8	4.2	41.1	63.7
2136-2-15-2	16.5	3.1	12.0	30.2	12.3	8.0	12.5	1.0	4.1	37.6	65.0
2136-2-15-3	16.7	3.3	13.4	29.2	8.4	9.8	14.0	0.9	4.0	43.3	62.8
2136-2-15-4	17.8	3.4	13.3	27.6	12.5	7.5	11.8	1.1	4.5	38.3	65.5
2136-2-15-5	16.6	3.3	15.3	28.3	8.8	9.2	13.6	0.8	3.7	42.4	63.4
Avg.	16.9	3.2	13.7	28.9	10.3	8.7	13.0	0.9	4.1	40.5	64.1
2136-3-8-1	18.1	2.9	8.5	29.4	12.7	8.2	13.3	1.5	5.0	39.9	65.5
2136-3-8-2	20.1	3.1	6.6	39.3	28.2	0.7	0.6	0.3	0.4	2.9	52.3
2136-3-8-3	19.8	3.3	7.1	27.9	15.3	7.2	12.0	1.7	4.9	37.4	65.4
2136-3-8-4	19.2	3.6	9.1	25.9	13.1	7.9	13.0	1.8	5.6	42.1	65.8
2136-3-8-5	16.6	3.2	9.2	29.8	11.8	9.2	13.6	1.6	4.6	41.1	62.8
Avg.	18.7	3.2	8.1	30.5	16.2	6.6	10.5	1.4	4.1	32.7	62.4
2136-4-2-1	18.6	5.0	12.6	26.1	11.9	8.6	11.2	1.3	4.0	39.7	60.6
2136-4-2-2	16.8	3.8	9.4	25.9	9.6	11.2	15.7	1.8	5.3	48.9	61.8
2136-4-2-3	17.0	3.8	8.6	26.6	10.5	10.5	15.5	1.7	5.3	46.9	63.1
2136-4-2-4	16.8	3.0	9.0	26.3	11.2	11.1	15.1	1.8	5.3	47.0	61.3
2136-4-2-5	17.0	2.9	6.0	44.1	29.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
Avg.	17.2	3.7	9.1	29.8	14.5	8.3	11.5	1.3	4.0	36.6	49.3

Fig. 14

Composição de ácidos Graxos (% em peso)

Evento										C18% de delta-9 elongase	C20% de delta-8 desatura-se
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	DGLA	ERA	ETA		
2130-1-29-1	17.5	3.4	10.8	23.7	5.6	17.4	15.0	2.2	3.8	56.7	49.0
2130-1-29-2	16.9	3.9	11.5	24.1	6.6	15.3	14.9	2.0	4.2	54.3	52.5
2130-1-29-3	17.4	3.7	11.1	22.3	6.1	17.0	14.5	2.6	4.5	57.6	49.2
2130-1-29-4	17.8	3.8	10.5	21.8	5.7	17.1	16.0	2.4	4.4	59.1	51.1
2130-1-29-5	17.2	4.2	9.8	23.1	6.6	15.9	14.5	2.9	5.0	56.3	50.9
Avg.	17.4	3.8	10.7	23.0	6.1	16.5	15.0	2.4	4.4	56.8	50.5
2130-1-43-1	17.5	2.9	6.9	45.5	26.3	0.4	0.0	0.1	0.0	0.6	0.0
2130-1-43-2	18.0	3.4	7.5	24.3	7.2	11.8	20.2	1.5	5.5	55.3	65.8
2130-1-43-3	20.7	5.5	12.3	23.8	5.6	11.2	15.1	1.2	3.9	51.7	60.4
2130-1-43-4	18.3	4.0	8.7	23.6	7.8	12.1	17.2	1.9	5.5	53.9	61.8
2130-1-43-5	23.9	7.6	16.1	17.7	4.5	10.6	13.9	1.3	3.9	57.2	59.9
Avg.	19.7	4.7	10.3	27.0	10.3	9.2	13.3	1.2	3.8	43.7	49.6
2130-1-51-1	17.4	4.6	9.8	24.1	7.2	13.8	15.7	2.1	4.3	53.5	55.6
2130-1-51-2	18.7	3.9	9.4	20.7	6.0	14.1	18.3	2.6	5.6	60.4	58.8
2130-1-51-3	18.4	3.8	9.3	20.4	6.6	13.4	19.0	2.3	5.9	60.0	61.3
2130-1-51-4	17.9	4.1	9.6	20.4	5.2	15.2	19.1	2.3	5.2	62.0	58.2
2130-1-51-5	21.6	6.4	12.8	20.1	7.6	11.4	12.4	2.4	4.1	52.3	54.5
Avg.	18.8	4.6	10.2	21.1	6.5	13.6	16.9	2.3	5.0	57.6	57.7
2130-1-54-1	16.4	4.2	13.5	28.5	6.9	11.0	14.6	1.0	3.7	46.1	60.6
2130-1-54-2	18.1	4.1	10.8	26.2	6.9	12.3	15.9	1.3	3.9	50.3	59.4
2130-1-54-3	17.5	4.1	11.9	27.2	7.3	10.2	16.6	0.8	3.7	47.6	64.9
2130-1-54-4	16.7	4.2	10.9	28.3	7.3	14.9	12.3	1.6	3.2	47.3	48.4
2130-1-54-5	17.1	4.3	12.0	27.0	7.3	10.6	15.6	1.1	4.3	47.9	62.9
Avg.	17.2	4.2	11.8	27.5	7.1	11.8	15.0	1.2	3.8	47.9	59.2
2130-1-61-1	21.4	5.2	7.3	19.5	6.1	13.7	15.6	3.2	7.0	60.7	57.2
2130-1-61-2	17.2	3.5	5.4	20.3	7.8	14.4	18.0	4.1	8.7	61.6	58.9
2130-1-61-3	17.3	4.4	6.9	25.0	9.4	13.1	14.1	3.1	5.7	51.1	55.0
2130-1-61-4	21.0	7.1	11.2	18.1	6.6	11.0	15.7	2.7	6.0	58.9	61.2
2130-1-61-5	20.1	4.3	6.7	19.9	5.9	14.7	17.3	3.3	6.7	61.9	57.2
Avg.	19.4	4.9	7.5	20.6	7.2	13.4	16.1	3.3	6.8	58.8	57.9

Fig. 15

Evento	Composição de ácidos Graxos (% em peso)											C20% de delta-8 desatura-se
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	20:0	20:1 (11)	EDA	DGLA	ERA	ETA	
ff1192-1	9.1	3.2	24.8	38.7	1.3	0.8	3.6	10.5	6.8	0.8	0.4	38.8
ff1192-2	9.5	3.4	20.0	30.0	0.8	0.9	3.6	18.2	11.7	1.3	0.6	38.7
ff1192-3	8.1	2.7	27.7	54.7	1.3	0.7	0.7	3.0	0.9	0.2	0.0	22.5
ff1192-4	7.5	2.7	25.7	41.1	0.7	0.7	2.6	13.0	5.1	0.8	0.2	27.9
ff1192-5	10.5	3.0	25.3	56.1	3.5	0.9	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	39.1
ff1192-6	8.0	3.0	23.2	39.9	0.6	0.7	2.3	14.9	6.1	0.8	0.2	28.7
ff1192-7	8.5	3.3	26.2	36.1	0.9	0.8	4.4	11.8	6.8	0.8	0.3	36.2
ff1192-8	10.4	3.8	20.1	34.9	1.4	1.1	2.2	16.3	8.3	1.2	0.4	33.3
ff1192-9	9.2	3.4	23.0	27.6	0.7	0.9	5.0	16.6	12.0	1.1	0.6	41.5
ff1192-10	9.9	3.4	20.5	25.7	0.6	1.0	3.8	17.5	15.4	1.3	0.8	46.3
ff1192-11	8.5	2.9	18.7	39.6	1.8	0.8	1.7	23.5	0.8	1.6	0.1	3.5
ff1192-12	7.7	2.9	23.1	33.6	0.4	0.7	4.3	18.0	7.7	1.0	0.3	29.8
ff1192-13	10.0	4.0	22.6	32.6	1.5	1.2	3.7	13.8	8.9	1.1	0.6	38.7
ff1192-14	8.9	3.2	22.4	37.0	0.9	0.9	3.1	14.8	7.6	1.1	0.4	33.3
ff1192-15	8.7	3.1	26.3	44.2	1.2	0.8	3.3	7.1	4.6	0.5	0.2	38.9
ff1192-16	10.7	2.8	24.8	56.8	3.2	0.9	0.4	0.3	0.2	0.0	0.0	34.7
ff1192-17	8.5	2.9	21.8	39.9	3.1	0.8	3.4	12.7	5.5	1.0	0.3	29.7
ff1192-18	8.3	3.1	23.3	38.4	0.7	0.7	3.3	14.4	6.6	0.8	0.3	31.2
ff1192-19	9.6	3.2	23.7	38.9	1.2	1.1	2.4	9.5	9.1	0.8	0.6	48.2
ff1192-20	7.9	2.7	24.3	43.5	0.8	0.8	2.4	11.8	5.0	0.7	0.2	29.4
ff1192-21	8.5	3.0	23.7	38.0	0.7	0.8	3.7	13.7	6.7	0.9	0.3	32.2

RESUMO

**“POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, POLIPEPTÍDEO, CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, CÉLULA VEGETAL, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSFORMADA, PARA FABRICAR ÁCIDOS GRAXOS POLI-
5 INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, PARA PRODUZIR PELO MENOS UM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO EM UMA CÉLULA VEGETAL OLEAGINOSA, PARA PRODUZIR ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DE CADEIA LONGA EM UMA CÉLULA VEGETAL, SEMENTES TRANSGÊNICAS, ÓLEOS OU SUBPRODUTOS, PLANTAS
10 OLEAGINOSAS, PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, SEMENTES TRANSGÊNICAS, ÓLEO, ALIMENTOS OU ALIMENTAÇÕES E PLANTAS DAS PROGÊNIES”**

Fragmentos de ácidos nucléicos e constructos recombinantes que compreendem tais fragmentos que codificam delta-8 desaturases junto com um
15 método para fabricar ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e o uso destas delta-8 desaturases em plantas.