

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 724**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008 E 08720622 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2133423**

54 Título: **Marcador de células germinales que utiliza el gen Vasa de peces**

30 Prioridad:

26.03.2007 JP 2007080022

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

24.04.2013

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO
UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND
TECHNOLOGY (50.0%)
5-7 KONAN 4-CHOME
MINATO-KU TOKYO 108-8477, JP y
NIPPON SUISAN KAISHA, LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YOSHIZAKI, GORO;
TAKEUCHI, YUTAKA;
NAGASAWA, KAZUE;
HIGUCHI, KENTARO;
MORITA, TETSURO y
KABEYA, NAOKI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 401 724 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcador de células germinales que utiliza el gen Vasa de peces.

La presente invención se refiere a una proteína Vasa de peces *Perciformes* tales como el atún, a un gen Vasa de peces *Perciformes* tales como el atún, a un método para detectar las células germinales de peces *Perciformes* tales como el atún utilizando dicha proteína Vasa o gen Vasa como diana, a un método para evaluar el crecimiento y/o la maduración de las células germinales de peces *Perciformes* donantes tales como el atún, que han sido trasplantadas en peces receptores de una especie diferente, utilizando el método de detección anteriormente

Antecedentes de la técnica

D1 (Xu *et al.*, Dev. Dynam. 233:872-882, 2005) da a conocer la expresión diferencial de ARN y proteína Vasa durante la espermatogénesis y la ovogénesis en la carpa gibel (*Carassius auratus gibelio*). Esta carpa es un vertebrado de reproducción bisexual y ginogenética.

D2 (Kobayashi *et al.*, Mech. Dev. 99:139-142, 2000) da a conocer la expresión diferencial de un gen homólogo de Vasa en las células germinales durante la ovogénesis y la espermatogénesis en el pez teleósteo *Oreochromis niloticus*.

D3 (Knaut *et al.*, Current Biology 12:454-466, 2002) da a conocer una región evolutivamente conservada en la UTR 3' de Vasa dirige la traducción del ARN a las células germinales en peces cebra.

D4 (Cardinali *et al.*, Biol. Reprod. 70:737-743, 2004) da a conocer la regulación hormonal de la expresión del ARN mensajero de tipo Vasa en el ovario del teleósteo marino *Sparus aurata*.

D5 (número de acceso de base de datos DQ174775) da a conocer la secuencia codificante completa del ARNm de la proteína de tipo Vasa (vas) de *Monopterus albus*.

Raz (Raz, Genome Biology 1(3), revisión 1017, 2000) expone la función y regulación de los genes de tipo Vasa en el desarrollo de las células germinales.

El documento WO 02/029064 describe un método para establecer la expresión específica de células germinales de secuencias de ácidos nucleicos en vertebrados.

Mediante análisis genético de *Drosophila* se ha puesto de manifiesto que los genes Oskar, Vasa, Tudor y Nanos presentan funciones esenciales en el mecanismo de determinación de las células germinales (por ejemplo Rongo C. *et al.*, Development 121:2737-2746, 1995). La totalidad de estos genes se acumula en el gránulo polar durante la formación de los óvulos, y al presentar este blastómero un factor de determinación materna, se determina el destino de la célula germinal. Se considera que el gen Vasa codifica la ARN helicasa dependiente de ATP y que sus funciones se asocian a la regulación de la traducción del ARNm en una proteína (por ejemplo Liang L. *et al.*, Development 120:1201-1211, 1994). Además, una estructura para su función enzimática se encuentra evolutivamente muy conservada. De esta manera, se han identificado genes homólogos de Vasa en muchas especies animales multicelulares, desde platelmintos (planarias) hasta seres humanos.

Basándose en los resultados anteriormente indicados, como método para separar fácilmente las células que presentan potencial de diferenciación de los óvulos que utiliza, a modo de indicador, la expresión de un gen marcador, sin realizar complicadas operaciones tales como la recombinación homóloga, se ha informado de un método para obtener una célula germinal, que comprende recuperar unas células que presentan potencial de diferenciación de células germinales a partir de un mamífero no humano transgénico, en el que se ha introducido un vector de expresión recombinante de manera que se encuentre bajo el control de la secuencia promotora de un gen homólogo de Vasa derivado del mamífero, utilizando la expresión del gen marcador a modo de indicador (por ejemplo las solicitudes de patente japonesa abiertas al público nº 2006-333762 y nº 2003-235558).

Por otra parte, las células germinales primordiales son células de origen para óvulos y espermatozoides, las cuales son modificadas para un individuo mediante procedimientos de maduración y fertilización. Se conoce un método para inducir la diferenciación de unas células germinales primordiales separadas, derivadas de peces, en una línea de células germinales, que comprende trasplantar las células germinales primordiales separadas, derivadas de peces, en el embrión temprano de un pez receptor de una especie diferente, y particularmente trasplantar las células germinales primordiales separadas en la cavidad peritoneal de un pez receptor de una especie diferente en un estadio temprano del desarrollo (por ejemplo las patentes japonesas abiertas al público nº 2006-333762 y nº 2003-235558).

En la actualidad, para el cultivo del atún se ha puesto en práctica principalmente un método en el que el pescador captura peces juveniles autóctonos (en general entre varias decenas y varios cientos por gramo) y se crían. En los

últimos años se han reducido las capturas de atún autóctono, por lo que se han limitado estrictamente las cuotas de captura de atunes maduros. Por lo tanto, no se garantiza un suministro estable de peces juveniles para el futuro mediante un método en el que se obtengan dichos peces juveniles de la naturaleza. Además, tal como en el caso del salmón y de *Pagrus major*, en el caso de que se estableciese una técnica de producción artificial en semilleros, se esperaría que pudiese llevarse a cabo la cría mediante alternancia de generaciones, seleccionando los peces progenitores que presentasen buenas características, y que los peces juveniles de calidad estable pudiesen suministrarse con una mejor eficiencia de cultivo. El mecanismo de maduración del atún todavía no ha sido clarificado suficientemente. Sin embargo, se considera que el atún alcanza la maduración inicial tras alcanzar su peso corporal varias decenas de kilogramos. Debido a que el tamaño corporal del atún es grande, a diferencia de otras especies de peces, se cría mediante producción en semillero mediante un método de recolección de huevos fertilizados depositados naturalmente por los peces parentales en un recinto o en una bahía cerrada utilizando una red finamente tejida. Debido a que *Pagrus major* y similares ovipositan en un tanque de agua, puede producirse fácilmente un dispositivo para recoger los huevos con una red mediante desbordamiento del agua marina de la superficie del tanque. Por el contrario, dicha operación realizada en mar abierto resulta dificultosa.

En el caso de que se requiera el apareamiento de peces individuales específicos con fines de cría o similares, se lleva a cabo la recolección artificial de huevos mediante compresión del abdomen de los peces hembra, así como la recolección del esperma de la misma manera, y los huevos y espermatozoides seguidamente se someten a inseminación artificial. Sin embargo, en el caso de que los peces progenitores sean de gran tamaño, como el atún, este método no resulta sencillo. Además, en el campo industrial, para la finalidad de controlar el tiempo de transporte y el periodo de cultivo de los peces, resulta posible incrementar la rentabilidad modificando el tiempo durante el que se producen los peces juveniles. Por lo tanto, resulta necesario controlar la temperatura del agua y el fotoperiodo en un sitio en el que los peces progenitores se encuentren en un ambiente controlado, de manera que se modifique la estación, controlando de esta manera el momento en el que los peces progenitores ovipositan. Sin embargo, en el caso de que los peces progenitores sean de gran tamaño, como el atún, resultan necesarios inversiones de personal y costes enormes.

La técnica de peces sustitutos es una técnica que permite que las especies de peces que resultan adecuadas para la producción de larvas produzcan los gametos de especies de peces que resultan inadecuadas para la producción de larvas o para depositar huevos y después someterlos a inseminación, de manera que resulte posible la producción sencilla de larvas a bajo coste. Por ejemplo, en el caso de que la técnica de peces sustitutos descrita en la patente japonesa abierta al público nº 2003-235558 anteriormente indicada al atún, de manera que resulte posible utilizar especies de peces de pequeño tamaño como peces receptores para la maduración de células germinales derivadas de atunes, puede llevarse a cabo el cultivo, incluyendo la producción de larvas, en un tanque de agua de pequeño tamaño, y se espera que resulte en ahorros significativos de personal y costes. Durante el trasplante de las células germinales primordiales separadas, resulta necesario propagar las células germinales primordiales derivadas de los atunes que se han incorporado en las gónadas de un receptor, y detectar la proporción entre las células germinales derivadas del receptor y las células germinales derivadas del donante. Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para inducir la diferenciación de una célula germinal primordial en una línea celular germinal, comprendiendo el trasplante de una célula germinal primordial derivada de un pez *Perciformes* donante, tal como un atún, en el embrión temprano de un pez receptor de una especie diferente, en el que los óvulos y/o los espermatozoides derivados del pez donante se detectan específicamente, y dichos óvulos y/o espermatozoides derivados de dicho pez donante seguidamente se distinguen de las células germinales derivadas del pez receptor.

Se ha conseguido producir una trucha arcoiris a partir de un salmón masu (*Oncorhynchus masou*) mediante el trasplante heteroplástico de células germinales en peces salmónidos. En este trasplante se utilizó una línea de peces modificada genéticamente en la que se habían visualizado las células germinales de una trucha arcoiris con una proteína fluorescente verde, y como resultado se pudo confirmar fácilmente el éxito o el fracaso del trasplante. Además, con el fin de aplicar dicho trasplante heteroplástico de células germinales a especies de peces nativas y en peligro o a especies de peces cultivadas, ya se ha desarrollado un método para confirmar el éxito o el fracaso del trasplante sin utilizar una línea de peces genéticamente modificada. Mediante este método, se ha conseguido detectar células germinales de trucha arcoiris de tipo salvaje supervivientes en la glándula genital de un huésped *Salvelinus pulvius*. El objetivo consiste en aplicar dicho método de trasplante heteroplástico de células germinales a otras especies de peces marinos. Sin embargo, para conseguir este objetivo, resulta esencial el desarrollo de un método para confirmar si las células germinales trasplantadas de un pez *Perciformes* donante, tal como un atún, han sido incorporadas en la glándula genital de un huésped y han sobrevivido en la misma.

Con el fin de desarrollar dicho método, se ha seleccionado el gen Vasa de entre los genes Nanos, Deadend, Vasa y otros genes, que es conocido que se expresan específicamente en las células germinales primordiales. A continuación, se determinaron por primera vez las secuencias de nucleótidos de los genes Vasa de atún, verdel, caballa pintoja, bacoreta oriental y corvina. Además, se centró la atención en un gen Vasa del atún que se expresa específicamente en las células germinales primordiales y en el espermatogonio/oogonio del atún. Simultáneamente, con el fin de evitar la detección incorrecta del gen Vasa de la corvina, que presenta una homología muy alta con el gen Vasa del atún, se identificó una región característica del gen Vasa del atún, encontrando de esta manera que esta región puede utilizarse como marcador para la identificación de un espermatogonio/oogonio derivado de las

células germinales primordiales de un atún. Además, con el fin de analizar las células germinales del atún trasplantadas en la glándula genital de un huésped, resulta esencial establecer un método para distinguir un gen Vasa del atún de un gen Vasa del huésped y después detectar únicamente el gen del atún. Sin embargo, debido a que las secuencias de nucleótidos de los genes Vasa de las especies de peces presentan una homología extremadamente elevada entre sí, ha resultado difícil diseñar un juego de cebadores de PCR para detectar específicamente la expresión de un gen Vasa del atún. De esta manera, en el contexto de la presente solicitud se ha llevado a cabo una PCR anidada que permite realizar una amplificación altamente específica a partir de cantidades traza de ADN, de manera que han podido detectar específicamente un gen Vasa del atún. Además, se ha comparado la secuencia de un gen Vasa del atún con la secuencia de un gen Vasa de otros peces *Perciformes*, y como resultado, han identificado una secuencia de enzima de restricción que existe únicamente en el gen Vasa del atún. Mediante la combinación de dicha PCR anidada con un tratamiento con enzimas de restricción, se ha establecido un método para detectar más fiablemente un gen Vasa de atún, completando de esta manera la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a:

- (1) una proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 del listado de secuencias, y que se expresa específicamente en una célula germinal de atún,
- (2) un ADN codificante de una proteína consistente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 del listado de secuencias y que se expresa específicamente en una célula germinal de atún, y
- (3) un ADN que está constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1 del listado de secuencias.

Además, se describe:

- (4) una proteína está constituida por la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias; una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias, y que se expresa específicamente en la célula germinal de peces *Perciformes*, o una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% o más respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez perciforme,
- (5) un ADN codificante de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias; una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o delección de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez perciforme, o una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% o más respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez perciforme, y
- (6) un ADN que está constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 del listado de secuencias; un ADN, que se hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN consistente en una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 del listado de secuencias y que codifica una proteína específicamente expresada en las células germinales de un pez perciforme; un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que presenta una función como cebador o sonda producido a partir de una parte de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 del listado de secuencias y que codifica una proteína expresada específicamente en las células germinales de un pez perciforme; o un ADN que consiste de una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios nucleótidos con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 del listado de secuencias y que codifica una proteína expresada específicamente en las células germinales de un pez perciforme.

Además, la presente invención se refiere a:

- (7) un vector recombinante que comprende el ADN según (2) o (3),
- (8) un transformante transformado con el vector recombinante según (7),
- (9) una proteína de fusión o un péptido de fusión, o sal del mismo, obtenido mediante la unión de la proteína según (1) a una proteína marcadora y/o un péptido de etiqueta, también se describe

(10) un anticuerpo contra la proteína según (1), o la proteína de fusión o péptido de fusión según (9), o sal del mismo; la invención se refiere además a:

5 (11) un juego de cebadores o una sonda para detectar la presencia de un ADN y/o ARNm codificante de la proteína según (1).

Además, la presente invención se refiere a:

10 (12) un método para detectar una célula germinal primordial, un espermatogonio o un oogonio derivado de un pez *Perciformes* donante que ha sido trasplantado en un pez receptor de una especie diferente, comprendiendo el método la utilización del juego de cebadores o sonda según (11),

15 (13) el método de detección según (12), que comprende: tratar un fragmento de ADN amplificado mediante PCR utilizando el juego de cebadores según (11) con por lo menos un enzima de restricción, y determinar si el fragmento de ADN amplificado se deriva o no del pez *Perciformes* donante, utilizando la longitud del fragmento de ADN digerido o no digerido a modo de indicador,

20 (14) el método de detección según (12) o (13), en el que el pez *Perciformes* donante es un atún,

(15) el método de detección según (14), en el que el juego de cebadores está diseñado para amplificar una región que comprende una secuencia de reconocimiento HpaI de enzima de restricción existente en un ADN codificante de la proteína según (1), y comprendiendo el método el tratamiento de un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando el juego de cebadores con HpaI, y determinar que el fragmento de ADN se deriva de ADN de atún rojo, tras su digestión, y

(16) el método de detección según (15), en el que la PCR es PCR anidada utilizando un primer juego de cebadores que consiste de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID nº 19 y nº 20 y un juego de cebadores anidados que consiste de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID nº 21 y nº 22.

30 (17) Todavía adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para detectar una célula germinal primordial, un espermatogonio o un oogonio derivado de un pez *Perciformes* donante, que ha sido trasplantado en un pez receptor de una especie diferente, comprendiendo el método la utilización del anticuerpo según (10),

35 (18) el método de detección según (17), en el que el pez *Perciformes* donante es un atún; también se describe:

(19) un método para evaluar el crecimiento y/o maduración de una célula germinal de atún derivada de un pez *Perciformes* donante trasplantado en un pez receptor de una especie diferente, que comprende el método de detección según cualquiera de entre (12) y (18), y

40 (20) el método de evaluación según (19), en el que el pez *Perciformes* donante es un atún.

Breve descripción de los dibujos

45 [Fig. 1]

La figura 1 es una vista que muestra los resultados obtenidos mediante tinción de los tejidos testiculares de un atún rojo mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ARN específica del gen Vasa del atún rojo.

50 [Fig. 2]

La figura 2 es una vista que muestra los resultados obtenidos mediante tinción de los tejidos testiculares de un atún rojo y los de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ARN específica del gen Vasa de cada pez.

55 [Fig. 3]

La figura 3 es una vista que muestra sitios reconocidos por los cebadores de detección y enzima de restricción del ADNc de Vasa del atún rojo.

60 [Fig. 4-1]

La figura 4-1 es una vista que muestra los resultados obtenidos mediante PCR utilizando, como molde, una muestra obtenida mediante la adición de una cantidad diferente de un ADNc derivado del ovario del atún rojo a un ADNc derivado del ovario de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*).

65

[Fig. 4-2]

La figura 4-2 es una vista que muestra una secuencia del gen Vasa del atún rojo (179 pb) amplificado por PCR, cortado por HpaI en fragmentos de 146 pb y 33 pb.

[Fig. 5]

La figura 5 es una vista que muestra los resultados obtenidos mediante análisis de una muestra recogida de la glándula genital de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*).

[Fig. 6]

La figura 6 es una vista que muestra una comparación entre una región del gen Vasa del atún rojo amplificada mediante la PCR anidada del Ejemplo 5, y las regiones del gen Vasa de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), una caballa y una bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*), que son altamente homólogas de la región del gen Vasa del atún rojo.

[Fig. 7]

La figura 7 es una vista que muestra los resultados obtenidos mediante la realización de una PCR anidada utilizando, a modo de molde, una muestra derivada del ovario de una caballa y del ovario de una bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*), seguido del tratamiento del producto de PCR con HpaI.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La proteína de la presente invención no se encuentra particularmente limitada, con la condición de que sea una proteína que consista en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 del listado de secuencias (proteína Vasa del atún); una proteína que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 y que se expresa específicamente en una célula germinal de atún; o una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 del listado de secuencias y que se expresa específicamente en una célula germinal de atún. Además, el término "atún" se utiliza en la presente invención como nombre genérico para los peces clasificados como *Perciformes*, *Scombroidei*, *Scombridae* y *Thunnus*. Entre los ejemplos específicos de estos atunes se incluyen el atún rojo, el atún patudo, el atún del sur, el atún de aleta amarilla, el atún albacora, el atún de aleta azul del norte y el atún tongol. De entre ellos resulta preferente el atún de aleta azul. La expresión "proteína expresada específicamente en una célula germinal de atún" se utiliza en la presente invención para referirse a una proteína que se expresa únicamente en una célula germinal primordial, un espermatogonio y/o un oogonio, que sea una célula germinal del atún, y que no se expresa en una célula germinal primordial, un espermatogonio y/o un oogonio, que sea una célula germinal de especies de peces diferentes del atún.

Además, la proteína de la presente invención no se encuentra particularmente limitada, con la condición de que sea una proteína consistente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4 (proteína Vasa de verde), SEC ID nº 6 (proteína Vasa de caballa pintoja), SEC ID nº 8 (proteína Vasa de bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*)) o SEC ID nº 10 (proteína Vasa de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*)) del listado de secuencias; una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10, y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*; o una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias, y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*. En la presente memoria, *Perciformes* incluye *Percoidei*, *Labroidei*, *Zoarcoidei*, *Notothenioidei*, *Trachinoidei*, *Blennoidei*, *Gobiesocoidei*, *Callionymoidei*, *Gobioidei*, *Acanthuridae*, *Scombroidei*, *Stromateoidei*, *Anabantoidei*, *Channoidei* y similares. Además, el verde y la caballa pintoja anteriormente indicados son peces pertenecientes a *Perciformes*, *Scombroidei*, *Scombridae*, *Scomber*. La bacoreta oriental anteriormente indicada es un nombre genérico para peces pertenecientes a *Perciformes*, *Scombroidei*, *Scombridae*, *Euthynnus*, e incluye la bacoreta oriental (nombre científico: *Euthynnus affinis*), la melva tazard o melva, el atún tongol, y similares. De esta manera, bacoreta oriental utilizado como nombre colectivo en la presente memoria se distingue de bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*), que indica una especie de pez concreta, basándose en la presencia o ausencia del nombre científico. La corvina honnibe anteriormente indicada es un nombre genérico para peces pertenecientes a *Perciformes*, *Percoidei*, *Sciaenidae*, *Nibea*, e incluye corvinas honnibe (nombre científico: *Nibea mitsukurii*), *Nibea albiflora*, nibeas soldados, corvina del sur, *Sphaeramia nematoptera*, corvinas y similares. De esta manera, corvina honnibe utilizado como nombre colectivo en la presente memoria se distingue de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) que indica una especie de pez concreta, basándose en la presencia o ausencia del nombre científico. Además, dichos atún, verde, caballa pintoja y bacoreta oriental se clasifican todos en *Scombroidei*, en *Perciformes*, y de esta manera, todas estas especies de peces particularmente se utilizan preferentemente en el trasplante heteroplástico.

La expresión anteriormente proporcionada "una secuencia de aminoácido que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos" se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de un número cualquiera de, por ejemplo, 1 a 20, preferentemente 1 a 15, más preferentemente 1 a 10, y todavía más preferentemente 1 a 5 aminoácidos. Además, la anteriormente descrita "secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10" no se encuentra particularmente limitada, con la condición de que presente una homología de 85% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10. De esta manera, dicha homología es, por ejemplo, de 85% o superior, preferentemente de 90% o superior, más preferentemente de 95% o superior, y de manera particularmente preferente, de 98% o superior.

Un método para obtener o preparar la proteína de la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Puede utilizarse cualquiera de entre una proteína derivada naturalmente aislada, una proteína sintetizada químicamente y una proteína recombinante producida mediante una técnica de recombinación genética. En el caso de obtener una proteína derivada naturalmente, la proteína de la presente invención puede obtenerse a partir de células que expresan dicha proteína mediante la combinación apropiada de métodos de aislamiento y purificación de proteínas.

En el caso de la preparación de la proteína de la presente invención mediante síntesis química, se aplican métodos de síntesis química tales como el método del Fmoc (método del fluorenilmetiloxycarbonilo) o el método del tBoc (método del t-butiloxycarbonilo) para obtener la proteína de la presente invención. Además, la proteína de la presente invención también puede sintetizarse basándose en la información de secuencia de aminoácidos utilizando diversos tipos de sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente.

En el caso de la preparación de la proteína de la presente invención mediante una técnica de recombinación genética, se introduce un ADN codificante de la proteína en un sistema de expresión preferente, de manera que se prepara la proteína de la presente invención. Entre dichos métodos de preparación de proteínas, resulta preferente una técnica de recombinación genética que es capaz de preparar una gran cantidad de proteínas mediante operaciones comparativamente fáciles.

En el caso de que la proteína de la presente invención se prepare mediante dicha técnica de recombinación genética, con el fin de recuperar y purificar la proteína a partir de un cultivo celular, se lleva a cabo la precipitación con sulfato amónico o etanol y la extracción con ácido, y después, se utilizan métodos conocidos, incluyendo la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía en fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía en hidroxipatito y la cromatografía de lectina. Preferentemente se utiliza la cromatografía líquida de alto rendimiento.

En particular, como columna utilizada en la cromatografía de afinidad, por ejemplo, se utiliza una columna a la que se permite la unión de un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal contra la proteína de la presente invención, o en el caso de que se añada un péptido de etiqueta ordinario a la proteína anteriormente indicada de la presente invención, se utiliza una columna a la que se permite la unión de una sustancia con afinidad para el péptido de etiqueta, con el fin de obtener un producto purificado, tal como una proteína. Además, la proteína de la presente invención preparada mediante los métodos anteriormente indicados puede utilizarse en un método para detectar específicamente una célula germinal primordial, un espermatogonio y/o un oogonio derivado de *Perciformes*.

Además, el experto en la materia podrá preparar u obtener apropiadamente una proteína que está constituida por una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10, o una proteína consistente de una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 del listado de secuencias, basándose en la información sobre la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1, nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 del listado de secuencias, que se proporciona a título de ejemplo de una secuencia de nucleótidos codificante, respectivamente, de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10. Por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (reacción de PCR) utilizando, como cebadores, oligonucleótidos sintetizados basándose en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1, nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9, o mediante hibridación utilizando, como sonda, un oligonucleótido sintetizado basándose en la misma secuencia de nucleótidos anteriormente indicada, se criban homólogos de ADN de una especie de atún diferente del atún de aleta azul, bajo condiciones apropiadas, con el fin de aislarlos. SE clona el ADN de longitud completa de dicho ADN homólogo, se incorpora en un vector de expresión, y después se permite que se expresa en un huésped adecuado, de manera que pueda producirse una proteína codificada por el ADN homólogo.

Puede sintetizarse un oligonucleótido según un método ordinario, por ejemplo utilizando diversos sintetizadores de ADN comúnmente disponibles. Además, puede llevarse a cabo una reacción de PCR según un método ordinario utilizando el ciclador térmico Gene Amp PCR system 2400 fabricado por Applied Biosystems, y utilizar la ADN polimerasa Taq (fabricada por Takara Bio Inc.) o KOD-Plus- (fabricado por Toyobo Co., Ltd.).

Además, la proteína anteriormente indicada de la presente invención puede permitirse la unión de una proteína marcadora y/o un péptido de etiqueta para producir una proteína de fusión. El tipo de proteína marcadora no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que sea una proteína marcadora convencionalmente conocida. Entre los ejemplos específicos de dicha proteína marcadora se incluyen luciferasa, fosfatasa alcalina, enzimas tales como la HRP, una región Fc de anticuerpo y sustancias fluorescentes tales como GFP, YFP, CFP, DsRed y acuorina. Entre los ejemplos específicos de dicho péptido de etiqueta se incluyen péptidos de etiqueta convencionalmente conocidos, incluyendo epítomos de etiqueta tales como HA, FLAG y Myc, etiquetas de afinidad tales como GST, proteínas de unión a maltosa, péptidos biotinilados y oligohistidina. Dicha proteína de fusión puede producirse mediante un método ordinario, y resulta útil para la purificación de la proteína de la presente invención utilizando la afinidad de Ni-NTA por una etiqueta de His, la detección de la proteína de la presente invención o la cuantificación de un anticuerpo contra la proteína de la presente invención, y también resulta útil como reactivo en estudios en el presente campo.

A continuación, el ADN de la presente invención no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que sea un ADN codificante de una proteína consistente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, un ADN codificante de una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 y que se expresa específicamente en una célula germinal de atún, un ADN codificante de una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 y que se expresa específicamente en una célula germinal de atún, un ADN consistente de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1 (un gen Vasa de atún de aleta azul), un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN consistente de una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1 y que codifica una proteína expresada específicamente en una célula germinal de atún, un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN que consiste de una secuencia de nucleótidos que presenta una función como cebador o una sonda producida a partir de una parte de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1 del listado de secuencias y que codifica una proteína que se expresa específicamente en una célula germinal de atún, o un ADN que consiste de una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios nucleótidos respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1, y que codifica una proteína expresada específicamente en una célula germinal de atún. La expresión anteriormente proporcionada "una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios nucleótidos" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de un número dado cualquiera de entre, por ejemplo, 1 y 20, preferentemente de entre 1 y 15, más preferentemente de entre 1 y 10, y todavía más preferentemente de entre 1 y 5 nucleótidos.

Por lo tanto, el ADN de la presente invención codificante de una proteína que se expresa específicamente en una célula germinal de atún puede codificar una proteína que comprende una delección, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o varias posiciones, a menos que altere la función de una proteína Vasa de atún. Dicho ADN codificante de una proteína que se expresa específicamente en una célula germinal de atún también puede obtenerse sometiendo uno o más nucleótidos en uno o más sitios específicos a una delección, sustitución, inserción o adición de uno o más nucleótidos, de manera que se modifique la secuencia de nucleótidos, por ejemplo mediante mutagénesis sitio-dirigida. Además, el ADN modificado anteriormente indicado también puede obtenerse mediante mutagénesis convencionalmente conocida. Además, es generalmente conocido que las secuencias de aminoácidos de proteínas y las secuencias de nucleótidos codificantes de las mismas son ligeramente diferentes entre especies. De esta manera, resulta posible obtener un ADN codificante de una proteína que se expresa específicamente en células germinales del atún de aleta azul a partir de una especie de atún diferente del atún de aleta azul.

Además, el ADN de la presente invención no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que sea un ADN codificante de una proteína consistente de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10, un ADN codificante de una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10 y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*, un ADN codificante de una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 85% respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 ó nº 10, y que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*, un ADN consistente de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3 (gen Vasa del verdel), nº 5 (gen Vasa de la caballa pintoja), nº 7 (gen Vasa de bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*)) o nº 9 (gen Vasa de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*)), un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN consistente de una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 10 y que codifica una proteína que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*, un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas con un ADN que consiste de una secuencia de nucleótidos que presenta una función como cebador o sonda producido a partir de una parte de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 y que codifica una proteína que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*, o un ADN que consiste de una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de

uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 3, nº 5, nº 7 ó nº 9 y que codifica una proteína que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes*. La expresión anteriormente indicada "secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios nucleótidos" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de un número cualquiera de entre, por ejemplo 1 y 20, preferentemente de entre 1 y 15, más preferentemente de entre 1 y 10, y todavía más preferentemente de entre 1 y 5 nucleótidos.

El ADN de la presente invención codificante de una proteína que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes* puede codificar una proteína que comprende una delección, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o varias posiciones, a menos que altere negativamente la función de una proteína Vasa. Dicho ADN codificante de una proteína que se expresa específicamente en las células germinales de un pez *Perciformes* también puede obtenerse sometiendo uno o más nucleótidos en uno o más sitios específicos a una delección, sustitución, inserción o adición de uno o más nucleótidos, de manera que se modifica la secuencia de nucleótidos mediante, por ejemplo, mutagénesis sitio-dirigida. Además, el ADN modificado anteriormente indicado también puede obtenerse mediante mutagénesis convencionalmente conocida.

Por ejemplo, tal como se ha indicado anteriormente, un ADN consistente de una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios nucleótidos (ADN mutante) también puede producirse mediante cualesquiera métodos dados que sean conocidos por el experto en la materia, tales como la síntesis química, un método de ingeniería genética, o la mutagénesis. Específicamente, se introduce una mutación en un ADN que consiste de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1 mediante un método que permite que un agente que actúa como mutágeno entre en contacto y actúe sobre el ADN, un método de aplicación de rayos ultravioletas en el ADN, un método de ingeniería genética, o similares, obteniendo de esta manera un ADN mutante. La mutagénesis sitio-dirigida utilizada como método de ingeniería genética es un método útil capaz de introducir una mutación específica en un sitio específico, y dicho método se lleva a cabo según los métodos descritos en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1-38, John Wiley & Sons (1987-1997), etc. Al permitir que dicho ADN mutante se exprese en un sistema de expresión adecuado, puede obtenerse una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos.

La expresión anteriormente indicada "bajo condiciones restrictivas" se utiliza para referirse a condiciones bajo las que se forma un denominado híbrido específico y no se forma un híbrido no específico. Entre los ejemplos específicos de dichas condiciones restrictivas se incluyen: condiciones bajo las que partes de ADN con una homología de 50% o superior, y preferentemente de 70% o superior, se hibridan entre sí, y partes de ADN con una homología inferior de la indicada anteriormente no se hibridan entre sí; y condiciones de lavado en hibridación southern ordinaria bajo las que la hibridación se lleva a cabo a 65°C en una concentración salina correspondiente a una solución 1xSSC (en la que la composición de una concentración de 1 vez de solución de SSC consiste de cloruro sódico 150 mM y citrato sódico 15 mM) y SDS al 0,1%, ó 0,1xSSC y 0,1 SDS.

Además, la expresión anteriormente indicada "ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas" se utiliza para referirse a un ADN obtenido mediante la aplicación de un método de hibridación de colonias, un método de hibridación de placas, una hibridación en filtro southern, o similares, utilizando un ácido nucleico tal como ADN o ARN como sonda. Un ejemplo específico de dicho ADN es un ADN que puede identificarse llevando a cabo una hibridación a 65°C en presencia de NaCl 0,7 a 1,0 M con un filtro sobre el que se ha inmovilizado un ADN o fragmento del mismo derivado de una colonia o placa, y después se ha lavado el filtro a 65°C utilizando una solución aproximadamente 0,1 a 2 x SSC.

La hibridación puede llevarse a cabo según el método descrito en Molecular Cloning, 2a edición. Un ejemplo de un ADN capaz de hibridarse con otro ADN bajo condiciones restrictivas es un ADN que presenta un determinado nivel de homología respecto a la secuencia de nucleótidos de un ADN utilizado como sonda. Un ejemplo preferente de dicho ADN es un ADN que presenta una homología de, por ejemplo, 60% o superior, preferentemente de 70% o superior, más preferentemente de 80% o superior, todavía más preferentemente de 90% o superior, de manera particularmente preferente de 95% o superior, y todavía más preferentemente de 98% o superior, respecto a otro ADN.

Un método para obtener o reparar un ADN de la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Se prepara una sonda o cebador apropiado basándose en la información de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1 o la información de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 dada a conocer en la presente memoria. A continuación, utilizando dicha sonda o cebador, se criba una biblioteca de ADNc en la que se estima que existe el ADN, con el fin de aislar el ADN de interés. Alternativamente, dicho ADN también puede prepararse llevando a cabo síntesis química de acuerdo con un método ordinario.

Por ejemplo, se prepara una biblioteca de ADNc a partir del atún de acuerdo con un método ordinario, y después se selecciona un clon deseado de dicha biblioteca utilizando una sonda apropiada específica para el ADN genético de la presente invención, con el fin de obtener el ADN genético de la presente invención. Además, la separación del

ARN total del atún, la separación y purificación de ARNm, la obtención del ADNc y la clonación del mismo, pueden llevarse a cabo de acuerdo con métodos ordinarios. Entre los ejemplos de un método de cribado del ADN genético de la presente invención a partir de una biblioteca de ADNc se incluyen métodos utilizados comúnmente por el experto en la materia, tales como el método descrito en Molecular Cloning, 2a edición.

El vector recombinante de la presente invención no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que comprenda el gen anteriormente indicado de la presente invención y sea capaz de expresar una proteína específica de las células germinales de un pez *Perciformes*. El vector recombinante de la presente invención puede construirse integrando apropiadamente el ADN de la presente invención en un vector de expresión utilizado para las células animales o un vector de expresión utilizado para microorganismos. A modo de dicho vector de expresión, resulta preferente un vector de expresión capaz de replicarse autónomamente en una célula huésped, o un vector de expresión capaz de incorporarse en el cromosoma de una célula huésped. Además, preferentemente puede utilizarse un vector de expresión que comprenda secuencias de control tales como un promotor, un intensificador y un terminador, en posiciones que permitan la expresión del ADN de la presente invención. Además, puede utilizarse el ADN de la presente invención producido mediante el método anteriormente indicado, para un método de detección específica de una célula germinal primordial, un espermatogonio y/o un oogonio derivado de *Perciformes*.

Además, el vector recombinante de la presente invención también puede utilizarse para producir un transformante. Para la transformación, pueden aplicarse todos los métodos de transformación utilizados comúnmente. Por ejemplo, se empaqueta un vector en una partícula retroviral o en una partícula de virus lambda y seguidamente se transfiere a una célula. De otra manera, mediante la aplicación de microinyección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio o un método biolístico (por ejemplo el bombardeo con tungsteno) o permitiendo que entre en contacto un vector o constructo de ácido nucleico desnudo con una célula en una solución, puede introducirse dicho vector en una célula. Entre dichos métodos resulta particularmente preferente la introducción mediante microinyección. Dicha microinyección puede llevarse a cabo antes o después de la fertilización, o en el estadio de dos células, de cuatro células o de ocho células después de la división. Las células obtenidas se cultivan mediante un método ordinario, de manera que pueden crecer hasta formar un embrión, un alevín, un pez juvenil, un pez joven y un pez maduro, que presenta células germinales.

Entre los ejemplos de un anticuerpo de la presente invención se incluyen un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo bifuncional capaz de reconocer simultáneamente dos epítopos. Estos anticuerpos se producen mediante la administración de un fragmento que contiene la proteína de la presente invención o un epítipo, un análogo, o similares en animales (preferentemente animales aparte del ser humano) de acuerdo con protocolos utilizados comúnmente. Por ejemplo, con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal, pueden utilizarse cualesquiera métodos dados, tales como un método de hibridoma (Nature 256:495-497, 1975), un método de trioma, un método de hibridoma de células B humanas (Immunology Today 4:72, 1983) el método del hibridoma del EBV (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, páginas 77 a 96, Alan R. Liss, Inc., 1985), que generan anticuerpos producidos a partir de un producto de cultivo de una línea celular continua. Además, también puede utilizarse un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos anteriormente indicados y similares, de manera similar a los anticuerpos anteriormente indicados. Como antígeno puede sintetizarse y utilizarse un péptido consistente de 4 o más, preferentemente 6 o más, y más preferentemente 10 o más aminoácidos, codificados por el gen Vasa de la presente invención. Alternativamente puede utilizarse un producto obtenido de la expresión de una parte o de la totalidad del gen Vasa de la presente invención en la célula de un fago, en *Escherichia coli*, en Actinomycetes, en bacterias del ácido láctico, en levaduras, en una célula en cultivo o similar.

De otra manera, la totalidad o una parte de un producto del gen Vasa puede purificarse a partir de un pez individual o células del mismo y utilizarse seguidamente. En la producción del antígeno anteriormente indicado, con el fin de producir un anticuerpo que reconoce específicamente el producto del gen Vasa de un pez *Perciformes* como diana, resulta preferente seleccionar una región génica codificante de una secuencia de aminoácidos específica de la especie de pez *Perciformes* como diana a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína Vasa. En la inmunización con el antígeno anteriormente indicado puede utilizarse el antígeno directamente. De otra manera, el antígeno puede mezclarse o unirse a un agente inmunopotenciador o adyuvante, tal como un hapteno, y utilizarse seguidamente.

Los anticuerpos marcados producidos mediante marcaje de los anticuerpos anteriormente indicados, por ejemplo con sustancias fluorescentes tales como FITC (isocianato de fluoresceína) o isocianato de tetrametilrodamina, con isótopos radioactivos tales como ¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³⁵S ó ³H, o con enzimas tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa, β-galactosidasa o ficoeritrina, o proteínas de fusión producidas mediante función de dichos anticuerpos con proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) pueden utilizarse para detectar y medir la proteína de la presente invención mediante un método inmunológico. Entre los ejemplos de dicho método inmunológico se incluyen un método RIA, un método ELISA, un método de anticuerpos fluorescentes, un método de placas, un método de puntos, un método de reacción de aglutinación de eritrocitos y el método de Ouchterlony.

Además, la presente invención se refiere a un juego de cebadores para detectar la presencia de un ADN y/o ARNm codificante de la proteína Vasa de la presente invención que se expresa específicamente en una célula germinal.

Por ejemplo, con respecto a un juego de cebadores para detectar la presencia de un ADN o ARNm codificante de una proteína que se expresa específicamente en una célula germinal de atún, la longitud de la secuencia de cebador, el sitio de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico con la que es complementaria el juego de cebadores, y similares, no se encuentran particularmente limitados, con la condición de que sea un juego de cebadores complementarios capaces de hibridarse con una parte de una secuencia cadena arriba o cadena abajo del ADN, ARNm o ADNc de la proteína. Por ejemplo, aunque dichos cebadores comprendan una secuencia en la que una parte no es complementaria a la secuencia de ADN, ARNm o ADNc del péptido anteriormente indicado en el extremo 5'-terminal ó 3'-terminal o en ambos extremos, en la medida en que puedan hibridarse con ella, pueden utilizarse como cebadores. Además, con el fin de evitar la amplificación no específica o para introducir un sitio de reconocimiento de enzima de restricción adecuado, resulta posible utilizar un cebador que presente una secuencia de apareamiento incorrecto que no sea complementaria a dicho ADN, ARNm o ADNc.

Además, la presente invención se refiere a una sonda para detectar la presencia de un ADN y/o ARNm codificante de la proteína de la presente invención que se expresa específicamente en una célula germinal. Un ejemplo preferente de una sonda para detectar la presencia de un ADN o ARNm codificante de una proteína que se expresa específicamente en una célula germinal de atún es una sonda, que es la totalidad o una parte de cadena antisentido capaz de hibridarse con un ADN (ADNc) o ARN (ARNc) codificante de dicho péptido, y que presenta la longitud necesaria para ser una sonda (por lo menos 20 bases). Por ejemplo, aunque dicha sonda comprenda una secuencia en la que una parte no sea complementaria a la secuencia de ADN, ARNm o ADNc del péptido anteriormente indicado en el extremo 5'-terminal ó 3'-terminal o en ambos extremos, en la medida en que la sonda pueda hibridarse con ella, podrá utilizarse como sonda. Además, para una fácil detección, puede utilizarse una sonda a la que se haya añadido cualquier secuencia dada. Todavía adicionalmente, para una fácil detección, también puede utilizarse una sonda cuyo extremo 5'-terminal haya sido marcado. Entre los ejemplos de una sustancia marcadora utilizada en la presente memoria se incluyen la biotina, a fluorescencia y P32.

El método de la presente invención para identificar una célula germinal primordial, un espermatogonio o un oogonio derivado de un pez donante no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que sea un método por el que se detecte la presencia de un ADN y/o ARNm codificante de una proteína que se expresa específicamente en una célula germinal de atún en una muestra mediante un método de hibridación *in situ* o similar utilizando el juego de cebadores o sonda marcada de la presente invención anteriormente indicados, y en el caso de que la presencia de dicho ADN y/o ARNm se detecte en la muestra, se evalúa la presencia en la muestra de una célula germinal primordial, de un espermatogonio o de un oogonio derivado de un atún. A modo de método de identificación altamente exacto y particularmente sencillo puede existir un método para tratar un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando el juego de cebadores anteriormente indicado de la presente invención con por lo menos un enzima de restricción, utilizando seguidamente la longitud del fragmento de ADN tratado a modo de indicador. El enzima de restricción utilizado en el método anteriormente indicado no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que se utilice para obtener fragmentos de ADN de diferentes longitudes de un ADN derivado de un pez donante y un ADN derivado de un pez receptor de una especie diferente, tal como un enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento existe en una región de gen Vasa de un pez donante que debe amplificarse pero que no existe en una región de gen Vasa de un pez receptor de una especie diferente, un enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento no existe en una región de gen Vasa de un pez donante que debe amplificarse pero que existe en una especie diferente de región de gen Vasa de pez receptor, y un enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento existe tanto en la región de gen Vasa de un pez donante que debe amplificarse como en una región de gen Vasa de un pez receptor de una especie diferente, pero cuyo número de dichas secuencias de reconocimiento es diferente. A título de ejemplo preferido, al seleccionar un atún como pez donante y seleccionar una corvina honnibe y una caballa o una bacoreta oriental como pez receptor de una especie diferente, puede utilizarse, por ejemplo, Hapl. Un ejemplo de un método de identificación en el que se utiliza Hapl, anteriormente indicado, es un método que comprende llevar a cabo una PCR anidada utilizando un primer juego de cebadores que consiste de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID nº 19 y nº 20, y un juego de cebadores anidados que consiste de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID nº 21 y nº 22, tratando a continuación el producto de la PCR anidada con el enzima de restricción Hapl, y determinando a continuación que el producto de PCR anteriormente indicado es un gen Vasa de atún, al digerir el producto de PCR para formar fragmentos de ADN de 146 pb y 33 pb.

El método de identificación de la presente invención resulta útil como método para evaluar el crecimiento y/o la maduración de una célula germinal derivada de un pez donante trasplantada en un pez receptor de una especie diferente. Por ejemplo, se trasplante una célula germinal primordial separada de un atún al embrión temprano de un pez receptor de una especie diferente, tal como una corvina, una caballa, una bacoreta oriental o un *Pagrus major*, llevando a cabo la producción de larvas de manera más simple y mayor eficiencia que con un atún, y preferentemente dicha célula germinal primordial se trasplanta en la cavidad abdominal de un pez receptor de una especie diferente en el estado temprano de desarrollo, de manera que puede inducirse la diferenciación de la célula germinal primordial para que se diferencie en una línea de células germinales. De esta manera, en un pez receptor de una especie diferente, se induce una célula germinal primordial derivada del atún para diferenciarse en un oocito o en un espermatogonio, y se induce adicionalmente para diferenciarse en un óvulo o un espermatozoide, permitiendo de esta manera el crecimiento y la cría del atún.

La presente invención se describe más específicamente en los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance técnico de la presente invención.

Ejemplo 1

(Extracción de ARN a partir de tejidos testiculares de atún de aleta azul y síntesis de ADNc)

Se extirparon los testículos de cada uno de los cinco peces de atún de aleta azul macho en cultivo (3 años de edad, peso corporal: aproximadamente 50 kg), seguido de la rápida congelación sobre hielo seco. Se extrajo el ARN total de los tejidos testiculares obtenidos utilizando ISOGEN (fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.). Con el fin de descomponer el ADN, se añadió una solución de Tris-HCl 40 mM (pH 7,8) que contenía 2,2 U/ml de ADNasa RQ1, sin ARNasa (fabricada por Promega), inhibidor de ARNasa (fabricado por Toyobo Co., Ltd.), NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM y ditiotreitól (DTT) 10 mM, y la mezcla obtenida seguidamente se incubó a 37°C durante 60 minutos. A continuación, se llevó a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol de la solución de reacción, de manera que se purificase el ARN total y después se midieron la concentración y la pureza de la misma. Mediante la utilización de 2 µg del ARN total extraído de esta manera como molde y utilizando un kit de síntesis de ADNc de cadena sencilla, perlas "Ready-To-Go You-Prime First-Strand" (fabricadas por GE Healthcare Biosciences), se sintetizó el ADNc.

Ejemplo 2

(Determinación de la secuencia del gen Vasa del atún de aleta azul)

A continuación, se realizó una comparación entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas Vasa de las especies de peces anteriormente indicadas (salmón arcoiris, pez cebra, *Oryzias latipes*, dorada, pejerrey, Tilapia, carpa dorada y carpa). A partir de estas secuencias, se seleccionaron regiones que se esperaba que presentasen una homología elevada y que estuviesen conservadas en la proteína Vasa del atún de aleta azul, y seguidamente se produjeron los cebadores degenerados mostrados en SEC ID nº 11 y nº 12. Utilizando estos cebadores, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando el ADNc sintetizado en el Ejemplo 1 a modo de molde, para amplificar un fragmento de ADN que se estimó que derivaba del gen Vasa del atún de aleta azul. Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN obtenido utilizando el analizador génico ABI Prism 3100-Avant (fabricado por Applied Biosystems).

Basándose en la secuencia de nucleótidos determinada, se diseñó un cebador 5'-RACE tal como se muestra en SEC ID nº 13 y un cebador 3'-RACE tal como se muestra en SEC ID nº 14. Mediante la utilización de estos cebadores, se llevó a cabo una reacción de RACE-PCR utilizando el kit GeneRacer™ (Invitrogen), para amplificar la secuencia en el extremo 5'-terminal y la secuencia en el extremo 3'-terminal del gen Vasa del atún de aleta azul. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los extremos 5' y 3'-terminales y seguidamente se ligaron a la secuencia de nucleótidos anteriormente indicada, con el fin de obtener la secuencia de nucleótidos de un gen Vasa de longitud completa de atún de aleta azul. Con respecto al extremo 5'-terminal, el ADNc de Vasa del atún de aleta azul utilizado como molde presentaba una estructura de horquilla y de esta manera resultaba imposible amplificar la secuencia hasta su extremo 5'-terminal únicamente con un cebador A 5'-RACE. Por consiguiente, se diseñó nuevamente un cebador B 5'-RACE tal como se muestra en SEC ID nº 15 a partir de una secuencia de nucleótidos determinada mediante una reacción de RACE-PCR utilizando el cebador A 5'-RACE y se llevó a cabo nuevamente una reacción de RACE-PCR para amplificar un fragmento de ADN en el extremo 5'-terminal, de manera que se determinase una secuencia de nucleótidos de longitud completa de Vasa de atún de aleta azul tal como se muestra en SEC ID nº 1 y una secuencia de aminoácidos de Vasa de atún de aleta azul tal como se muestra en SEC ID nº 2. Mediante la aplicación del mismo método, se determinó el gen Vasa de cada uno del verde (SEC ID nº 3), el gen Vasa de la caballa pintoja (SEC ID nº 5), el gen Vasa de la bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*) (SEC ID nº 7) y el gen Vasa de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) (SEC ID nº 9). A continuación, se determinaron las secuencias de aminoácidos (SEC ID nº 4, nº 6, nº 8 y nº 10) correspondientes a dichas secuencias génicas.

Ejemplo 3

(Producción de sonda de ARN)

En primer lugar, utilizando el ADNc sintetizado en el Ejemplo 1 como molde, se llevó a cabo una PCR con el cebador mostrado en SEC ID nº 15 y el cebador mostrado en SEC ID nº 16, de manera que se amplificase un fragmento Vasa de atún de aleta azul de 1.090 pb tal como se muestra en SEC ID nº 17. El fragmento de ADN obtenido se insertó en un vector pGEM-T easy (fabricado por Promega) y seguidamente se subclonó. Con el vector producido a modo de molde, se llevó a cabo una reacción de transcripción *in vitro* utilizando uridina trifosfato marcado con digoxigenina (DIG) (DIG-11-UTP, fabricado por Roche) y ARN polimerasa (ARN polimerasa SP6 ó T7, fabricada por Promega), de manera que se sintetizasen sondas de ADN de cadena de sentido y de cadena antisentido.

Ejemplo 4

(Hibridación *in situ*)

5 Se preparó una sección de 5 µm a partir de tejidos testiculares de atún de aleta azul fijados con un líquido de Bouin, y seguidamente se revelaron sobre un portaobjetos de vidrio para producir una muestra de sección de tejido. Se aplicó sobre la sección una solución de reacción de hibridación (una solución 5 x SSC (pH 4,5) que contenía 50 µg/ml de ARNt, formaldehído al 50%, 50 µg/ml de heparina y SDS al 1%) que contenía 1 µg/ml de la sonda de ARN producida en el Ejemplo 3, y seguidamente se hizo reaccionar a 65°C durante 18 horas. A continuación, el producto de reacción se lavó con solución 1 x SSC que contenía formamida al 50% y después se substituyó por una solución 1 x TBST. Seguidamente, la solución de reacción se incubó con una solución de bloqueo para la hibridación (fabricada por Roche) durante 1 hora.

15 A continuación, se llevó a cabo la amplificación de la señal utilizando un sistema TSATM PlusDNP AP (Perkin-Elmer Japan). Dicha amplificación de la señal comprende una etapa de incubación de la sección de muestra obtenida tras el bloqueo con fragmentos Fab anti-DIG marcados con peroxidasa de rábano picante (fragmentos Fab Anti-DIG-POD, fabricados por Roche) durante 30 minutos, y la etapa de adición de tiramida marcada con dinitrofenilo (DNP) gota a gota al portaobjetos de vidrio. Seguidamente, lo resultante se incubó con un anticuerpo anti-DNP marcado con fosfatasa alcalina (FA) durante 30 minutos. Tras lavar la solución de anticuerpo, se llevó a cabo una reacción de revelado del color utilizando una solución de NBT/BCIP (solución de 4-nitrozol de tetrazolio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol, fabricada por Roche) que es un sustrato colorante de la FA. Finalmente, se llevó a cabo una contratinción utilizando rojo nuclear rápido (fabricado por Vector Laboratories), seguido del montaje con un agente de montaje: Entellan New (fabricado por Merck).

25 Además, en el presente experimento, se produjo una sonda de ARN específicamente hibridante con el gen Vasa de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) y una sección de tejido testicular de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), y seguidamente se utilizaron a modo de controles negativos. Dicha sonda de ARN se produjo mediante inserción de la secuencia génica específica de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) mostrada en SEC ID nº 18 en un vector pGEM-T easy (fabricado por Promega), llevando a cabo después una reacción de transcripción *in vitro* mediante el mismo método que en el Ejemplo 3, utilizando la secuencia génica como molde. Además, se produjo una sección de muestra de tejido testicular de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) según el método del Ejemplo 4 y a continuación se llevó a cabo una hibridación *in situ*.

35 Como resultado de la hibridación *in situ*, tal como se muestra en la figura 1, se detectó una señal específica del espermatogonio en el testículo de un atún de aleta azul de 2 años de edad. Además, tal como se muestra en la figura 2, no se observó señal significativa de la sonda de ARN de Vasa del atún de aleta azul en los tejidos testiculares de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), que se utilizó a modo de control negativo. De esta manera, se considera que la sonda de ARN producida en el experimento se hibrida específicamente con Vasa de atún de aleta azul. Además, como resultado del experimento en el que se utilizó una sonda de ARN de sonda de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), se detectó una señal fuerte en los tejidos testiculares de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), mientras que no se observó señal significativa en los testículos de atún de aleta azul (figura 2). Estos resultados sugieren fuertemente que una sonda de ARN diseñada basándose en la secuencia de Vasa de atún de aleta azul probablemente resultará útil para la detección específica de una célula germinal de atún de aleta azul. De manera similar, los resultados sugieren fuertemente que una sonda de ARN diseñada basándose en la secuencia de Vasa de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) es probable que resulte útil para la detección específica de una célula germinal de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*).

Ejemplo 5

50 (Establecimiento del método para detectar gen Vasa derivado de células germinales de atún de aleta azul)

Con el fin de detectar la presencia de un célula germinal de atún de aleta azul trasplantada en la glándula genital de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), se estableció un método simple para detectar un gen Vasa de atún de aleta azul con una precisión elevada, en el que la PCR anidada que puede amplificar con elevada especificidad a partir de una cantidad de traza de ADN es combinada con un tratamiento con enzima de restricción. La figura 3 representa las regiones del gen Vasa de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) que presenta una homología elevada con la secuencia del gen Vasa de atún de aleta azul, y las posiciones de los cebadores y los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción HpaI, que se utilizaron en el experimento.

60 (1) Preparación de una muestra

Se obtuvo una sección de ovario de 2 mm cuadrados del ovario inmaduro de un atún de aleta azul o de una corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) y la sección recogida seguidamente se cortó en fragmentos con tijeras de disección. A continuación, las células se dispersaron mediante tratamiento con tripsina. Con respecto a los dos tipos obtenidos de suspensiones celulares, se midió la densidad celular utilizando un hemocitómetro. A continuación, se ajustó cada suspensión para que presentase un número de células de interés y seguidamente se mezclaron las dos

suspensiones. Además, al preparar una mezcla en la que se habían mezclado 10^1 células de ovario de atún con 10^6 células de ovario de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), para recoger un número exacto de células de ovario de atún de aleta azul, las células se clasificaron bajo un microscopio estereoscópico, utilizando un microinyector dotado de un microcapilar de vidrio.

(2) PCR anidada

Se extrajo el ARNt de las células en la solución mezclada preparada utilizando el kit de extracción de ARN total Quickprep (fabricado por GE Healthcare) y seguidamente se sintetizó ADNc utilizando la transcriptasa inversa ARNasa SuperScriptIII (fabricada por Invitrogen). Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando un primer juego de cebadores que consiste de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 19 y nº 20 y un juego de cebadores anidados que consiste de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID nº 21 y nº 22. Se preparó una solución de reacción de PCR utilizando TakaraExtaq (fabricado por Takara) de acuerdo con los protocolos adjuntos con el reactivo. Las condiciones de reacción de PCR consistían en: desnaturalización con calor a 94°C durante 2 minutos, desnaturalización con calor a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos y reacción de alargamiento a 72°C durante 30 segundos, y reacción de alargamiento a 72°C durante 3 minutos. Tal como se muestra en la figura 4-1, como resultado de la PCR anidada, se detectó una señal fuerte en una muestra que contenía ADNc derivado de ovario de atún (10^3 a 10^6 células). En contraste, en el caso del ADNc derivado de únicamente de ovario de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) o ADNc derivado de ovario de atún de aleta azul (10^2 células), no se detectó señal significativa en la PCR anidada. Estos resultados sugieren fuertemente que el gen Vasa del atún de aleta azul resultó específicamente amplificado por la PCR anidada del presente ejemplo.

(3) Tratamiento con enzima de restricción HpaI

A continuación, con el fin de confirmar que el fragmento génico amplificado no se ha derivado de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) utilizada como huésped, sino que se había derivado del atún de aleta azul, el producto de PCR se digirió con enzima de restricción. Debido a que la secuencia del gen Vasa del atún de aleta azul presenta una homología extremadamente alta respecto a la de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), es altamente probable que los dos tipos de genes resulten amplificados ambos por la PCR anidada. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 3, una secuencia de reconocimiento de HpaI existente en la secuencia del atún de aleta azul no se encuentra presente en la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*). De esta manera, mediante la detección de la digestión con el enzima de restricción HpaI, resulta posible determinar si el producto de PCR amplificado se ha derivado del atún de aleta azul o de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*). De hecho se llevó a cabo un experimento y, como resultado, la secuencia del gen Vasa (179 pb) amplificada mediante PCR anidada se dividió en fragmentos de 146 pb y 33 pb mediante digestión con HpaI (figura 4-2).

Ejemplo 6

Se confirmó la secuencia del producto de PCR de la muestra digerida. Como resultado, se puso de manifiesto que esta secuencia correspondía a la secuencia del atún de aleta azul. Estos resultados demuestran que el método de detección en el que se combina la PCR anidada con el tratamiento con HpaI es un método excelente para detectar específicamente un gen Vasa del atún de aleta azul sin necesidad de análisis de la secuencia, y que una célula germinal de atún de aleta azul que se ha mezclado con una glándula genital de corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*) puede detectarse simplemente mediante aplicación de dicho método de detección.

Ejemplo 7

Además, también se analizaron la caballa y la bacoreta oriental, los cuales podrían considerarse para su utilización como peces sustitutos del atún de aleta azul. Tal como se muestra en la figura 6, las secuencias del gen Vasa del atún de aleta azul, de la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), de la caballa y de la bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*) muestran una elevada homología entre ellas. Sin embargo, entre estas secuencias, únicamente se encuentra presente una secuencia de reconocimiento de HpaI en el atún de aleta azul. Se llevó a cabo una PCR anidada de la misma manera que en el Ejemplo 5. Como resultado, se obtuvieron señales fuertes tanto de la caballa como de la bacoreta oriental (*Euthynnus affinis*). Los productos de PCR se trataron con HpaI. Como resultado, los fragmentos génicos de caballa y de bacoreta oriental no resultaron digeridos, y únicamente se digirió el fragmento génico del atún de aleta azul (figura 7). Estos resultados sugieren que el método de detección en el que se combina la PCR anidada con el tratamiento con HpaI puede aplicarse como método para detectar una célula germinal de atún de aleta azul en un caso en el que no sólo la corvina honnibe (*Nibea mitsukurii*), sino también la caballa o la corvina honnibe (*Euthynnus affinis*), se utilizan como peces sustitutos.

Aplicabilidad industrial

Con el fin de examinar si células germinales derivadas de un pez donante, las cuales han sido trasplantadas en un pez receptor de una especie diferente mediante una técnica de pez sustituto, crecen o maduran o no en la gónada del pez receptor, resulta necesario utilizar, a modo de indicador, una característica que se exprese específicamente en las células germinales y que pueda utilizarse para distinguir el pez receptor del pez donante. El gen Vasa, que es

un gen específico de las células germinales, es específico de las células germinales primordiales y de un espermatogonio/oogonio, y no se expresa en las células somáticas. En la presente invención, se determinaron las secuencias del gen Vasa del atún, de la caballa, de la caballa pintoja, de la bacoreta oriental y de la corvina honnibe y se utilizó la expresión de dicho gen como marcador de las células germinales. Además, según la presente invención resulta posible detectar específicamente de manera única un gen Vasa de atún en las secuencias de gen Vasa que se encuentran altamente conservadas en los peces, sin necesidad de secuenciación. De esta manera, puede identificarse una célula germinal derivada de atún de manera fiable y simple en la gónada del pez receptor. Como resultado, puede llevarse a cabo el cultivo o cría del atún muy eficientemente. Además, mediante la utilización de los resultados anteriormente indicados, incluso en el caso de que se utilice no sólo un atún sino también otros peces *Perciformes* como donantes, puede detectarse eficientemente una célula germinal derivada del pez donante en la gónada de un pez receptor de una especie diferente.

Listado de secuencias

<110> Tokyo university of Marine Science and Technology Nippon Suisan Kaisha, Ltd. Nagasaki Prefecture
 <120> Marcador molecular para células germinales utilizando genes Vasa
 <130> F2007-014
 <150> JP2007-080022
 <151> 2007-03-26
 <160> 22
 <170> Patente en versión 3.1
 <210> 1
 <211> 2394
 <212> ADN
 <213> Atún de aleta azul
 <400> 1

```

ctacacaaat cagcgaccgg actgataaca ccatagactt ctgcttgaga agcttttgat      60
aagtgaaaaa agatggatga gtgggaagaa gagggaaata ctagcactat tacactaacc      120
agccgcacct caagtgaagg cacacaagga gacttctgga acaccaatgg tggatgaattt      180
ggaaggggtc gcggtggaag aggcagaggg agaggaggat ttaaagctc atactcctca      240
ggtggagatg ggaatgatga ggacaaatgg aacaatgcag gagggagaaag aggtgggttc      300
agaggtagag gaggccaagg gcgcggcaga ggattttgca gaatggatca aagtgaattc      360
aatggagatg acaatggaat gcgtgaaaat gggtagatag gaggaagagg gggcagagga      420
agaggaggag gtttcagcca aggtggcgac cagggtggca gaggaggctt tggaggaggt      480
tatcgtgga aagatgagga gatctttact cgaggggaag ataaagatcc agaaaagaag      540
gacgatagtg acagaccaa gatcacatat gtcccccaa ccctccctga agatgaggac      600
tccatttttt ccactatga aacagggtac aactttgaca agtatgatga catcatggtg      660
gatgttagtg gaaccaatcc accacaagct gtcattgact ttgatgaggc agcattgtgc      720
gagtcctga gaaaaaacgt cagcaagtct ggttatgtga agccgacccc tgtgcagaag      780
cacggcatcc caatcatctc tgctggtaga gatctcatgg cctgtgcccc gactggatct      840
ggtaaaacgg ctgcattcct gtccttatt ctgcagcagc tgatggcaga tgggtgtggca      900
gcaagtcgct tcagcgagct gcaggagcct gaagcaatca ttgtggcccc aaccaggagag      960
ctcatcaacc agatttacct ggaggccagg aagtttgctt ttgggacatg tgtgcgtcca      1020
gtggtggttt atggtggagt cagcactgga caccaataa gagaaatcga aaggggatgc      1080
aatgtagtgt gtggaacacc agggaggcta ttggatatga ttggaagagg aaaggttggg      1140
ttgagtaagc tgcggtactt ggtgctagat gaggccgacc ggatgttggg tatgggattt      1200
gagcctgaca tgcgcccctt ggtgggtcct cctggaatgc catccaaaga gaaccgtcag      1260
actctgatgt tcagtgcac ataccctgaa gacatccaga ggatggcggc tgacttcctc      1320
aagacagact atttgttcct ggctgtgggt gtggtgggtg gagcctgcag tgatgtggag      1380

```

cagacattta tccaagtcac aaagttctcc aagagagagc agctccttga cctcctgaag 1440
 accactggaa cggagcgcac catggtgttt gtagagacca aacgacaagc tgattttatt 1500
 gccacgttct tgtgccaaga gaaagttcca actaccagca ttcacggtga ccgagagcag 1560
 cgggagcgag agcaggctct ggcagacttc cgctctggta aatgtccagt cctagtagca 1620
 acctctgtag ctgcccgcgg tctggatatt ccagatgtac agcatgtggt taactttgac 1680
 ctccccaaca acattgatga atatgtccac cgtattggga ggactggccg ctgcggtaac 1740
 acagggaggg cagtgtcttt ctatgaccct gatgctgatg gccaaactggc tcgctccttg 1800
 gtcacagtcc tgtccaaggc ccagcaggaa gtgccttcat ggtagaaga gtctgcgttc 1860
 agcggacctg ctaccactgg ctttaaccca cctaggaaga actttgcctc cacagactcc 1920
 aggaagagag gatctttcca agacaacagt gtgaagagcc agccggctgt tcagactgca 1980
 gcggatgatg atgaggaatg ggaatagagg agcagcacac ccacacagca ttgacctgag 2040
 ttgcttttta ttttcagggtg ttcagtttgt tgtagtttta tcacgtttct gtttgaatat 2100
 agaaaaagtt tgtctcatgc cggacaaagt taaaaatgtc aagtgagggtg ttaaattggga 2160
 aaaccagttt ttttttgtgt gatctgtcat ttccattctt cactgactgg cattttgtga 2220
 agtttgtttt attttttatt gttttaatca tcacttgcac ttaaaatgtt taaaaaagga 2280
 aactgtgtct gacgacaaa aagtaaaact tataaatgtc aatttatattt tgttttctac 2340
 tcagaaaaag atcaataaat atttgttcaa agcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2394

<210> 2
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Atún de aleta azul

<400> 2

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

ES 2 401 724 T3

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

ES 2 401 724 T3

370 375 380
 Gly Ser Pro Gly Met Pro Ser Lys Glu Asn Arg Gln Thr Leu Met Phe
 385 390 395 400
 Ser Ala Thr Tyr Pro Glu Asp Ile Gln Arg Met Ala Ala Asp Phe Leu
 405 410 415
 Lys Thr Asp Tyr Leu Phe Leu Ala Val Gly Val Val Gly Gly Ala Cys
 420 425 430
 Ser Asp Val Glu Gln Thr Phe Ile Gln Val Thr Lys Phe Ser Lys Arg
 435 440 445
 Glu Gln Leu Leu Asp Leu Leu Lys Thr Thr Gly Thr Glu Arg Thr Met
 450 455 460
 Val Phe Val Glu Thr Lys Arg Gln Ala Asp Phe Ile Ala Thr Phe Leu
 465 470 475 480
 Cys Gln Glu Lys Val Pro Thr Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Glu Gln
 485 490 495
 Arg Glu Arg Glu Gln Ala Leu Ala Asp Phe Arg Ser Gly Lys Cys Pro
 500 505 510
 Val Leu Val Ala Thr Ser Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Pro Asp
 515 520 525
 Val Gln His Val Val Asn Phe Asp Leu Pro Asn Asn Ile Asp Glu Tyr
 530 535 540
 Val His Arg Ile Gly Arg Thr Gly Arg Cys Gly Asn Thr Gly Arg Ala
 545 550 555 560
 Val Ser Phe Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Gly Gln Leu Ala Arg Ser Leu
 565 570 575
 Val Thr Val Leu Ser Lys Ala Gln Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu
 580 585 590
 Glu Ser Ala Phe Ser Gly Pro Ala Thr Thr Gly Phe Asn Pro Pro Arg
 595 600 605
 Lys Asn Phe Ala Ser Thr Asp Ser Arg Lys Arg Gly Ser Phe Gln Asp
 610 615 620
 Asn Ser Val Lys Ser Gln Pro Ala Val Gln Thr Ala Ala Asp Asp Asp
 625 630 635 640
 Glu Glu Trp Glu

<210> 3

<211> 2413

<212> ADN

5 <213> Scomber japonicus

<400> 3

acacggcacc agacggctta gtgaccagac ggagaacaac gacttctgct gagaaccttt	60
tgataagtta acaaaatgga tgagtgggaa gaagagggaa ccgttagtac tattccatta	120
accagctaca cctcgaatga aggcacacaa ggagactcct ggaacactga tgctggtgaa	180
tgtgcaaggg gtcgcgagg aagaggaaga gggagaggag gatttaaaag ctcatactct	240
tcaggtggag atgggaatga tggggacaaa tggacaatg caggaggaga aagagggtgt	300
ttcagaggta gaggcgcca agggcggtgc agaggatttg gaagaacaga tcacagtga	360
gtcaatggag acgacagtgg agtgtgtgaa aacgggtttc gaggaggag agggggcaga	420
ggaagaggag gaagtttcag tcaaggctcg gaccgggtg gcagaggag ctttgaggga	480
ggttatcggg gaaaagatga agagatcttt tctcaagggg aagataaaga tcaagaaaag	540
aaggatgaca gtgagagacc aaaggtcacg tatgtgcccc ccacactccc cgaagatgaa	600
gactcaattt tttccatta tgaaacggg atcaactttg acaagtatga tgatatcatg	660
gtgatgtta gtggaaccaa tccaccacaa gctatcatga cttttgatga ggcggaattg	720
tgcgagtccc tgagaaaaaa tgtcagcaag tctggttatg tgaagccgac ccagtgacg	780
aaacatggca ttccaattat ctctgctggc agagatctca tggcctgtgc ccagactgga	840
tctggtaaaa cggtgcatt cctgtccct attctgcagc agctgatggc agatggtgtt	900
gcagccagtc gcttcagtga gctgcaggag cctgaagcaa ttattgtggc cccaacaagg	960
gagctcatta accagattta cctggaggct aggaagttg cctttgggac atgtgtgcgt	1020
ccagtgggtg tttatggtg agtcagcact ggacaccaa taagagacat tgaaagggga	1080
tgcaatgtag tgtgtggaac accaggcagg ctattggata tgattggtag aggaaagggt	1140
ggggtgagta agctgcggta cctagtccta gatgaggctg accggatgtt ggatatggga	1200
tttgagcctg atatgcgccg cttggtgggc tcacctggaa tgccatccaa agaggaccgt	1260
cagactctta tgttcagtgc tacgtaccct gaggacatac agaggatggc tgctgacttc	1320
ctgaagaccg actatttgtt cctggctgtg ggtgtggtgg gtggagcctg cagtgatgtg	1380
gagcagacat ttatccaagt caccaagttc tccaagagag agcaacttct tgacctcctg	1440
aagaccactg gaatggagcg caccatggtg tttgtggaga ccaagagaca agctgatttt	1500
atcgccacgt tcttgtgcca ggagaaagtt ccaaccacta gcattcatgg tgatcgagag	1560
cagcgggagc gagagcaagc tctggcagac ttccgctctg gtaaatgtcc agtcatggtg	1620
gcaacctctg tagctgcccg tggctctggat attccagatg tacagcatgt ggtgaacttt	1680
gacctccca acaacattga tgaatatgtt caccgtattg ggagaactgg ccgctgcggt	1740
aatactggga gggcagtgctc tttctatgac cctgatggtg atagccaact ggcttgcctc	1800

```

ttgggtcacag tcctgtccaa ggcccagcag gaagtgcctt catggttaga agagtctgcg 1860
ttcagcggat ctacttcctc tagcttcaaa ccaccagga agaactttgc ctccacagac 1920
tccaggaagg gaggatcttt ccaagacagt gtgcagagcc aggaggctgt tcagcctgct 1980
gccaatgatg atgaagaatg ggaatagaag aacagcacat aagcattgac cacacagcat 2040
tgacctgagt tactttttat tttcaggtgt tcagcttctt gtagttttat catagtgttt 2100
ttgttggaat acaaaaaaag tttcttgta gacaaagttt aaaatgctaa gtgagatggt 2160
aaatggtgaa accagttttt ttgtttttt tatgatctgt catctccatt cactgactgg 2220
cactttgtga acattttctt tttctttttt tattgtttta atcatcactt acatttaaag 2280
tgtttaaaaa agtaacaat gtgtctgatg gcaaaaagca aaacttttga aatgtcatat 2340
attttgtttt ctacgaggat aaagataaat aaatatttgt tctaagcaaa aaaaaaaaaa 2400
aaaaaaaaaa aaa 2413

```

<210> 4
 5 <211> 643
 <212> PRT
 <213> Scomber japonicus
 <400> 4

10

```

Met Asp Glu Trp Glu Glu Gly Thr Val Ser Thr Ile Pro Leu Thr
1      5      10      15

Ser Tyr Thr Ser Asn Glu Gly Thr Gln Gly Asp Ser Trp Asn Thr Asp
20     25     30

Ala Gly Glu Cys Ala Arg Gly Arg Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
35     40     45

Gly Phe Lys Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Gly Asp Gly Asn Asp Gly Asp
50     55     60

Lys Trp Asn Asn Ala Gly Gly Glu Arg Gly Gly Phe Arg Gly Arg Gly
65     70     75     80

Gly Gln Gly Arg Gly Arg Gly Phe Gly Arg Thr Asp His Ser Glu Val
85     90     95

Asn Gly Asp Asp Ser Gly Val Cys Glu Asn Gly Phe Arg Gly Gly Arg
100    105    110

Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Phe Ser Gln Gly Arg Asp Pro Gly
115    120    125

Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Gly Tyr Arg Gly Lys Asp Glu Glu Ile
130    135    140

Phe Ser Gln Gly Glu Asp Lys Asp Gln Glu Lys Lys Asp Asp Ser Glu

```

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

[illegible]

<210> 5
<211> 2435
<212> ADN
<213> Scomber australasicus

<400> 5

ggaagtggca accctacagg tcggagtgca aagtgtgcac acggcaccag acggcttagt 60
gaccagacgg agaacaacga cttctgcgga ggagcttttg ataagttaac aaaaatggat 120

gagtgggaag aagagggaac cgtagtact attccattaa ccagctacac cccgaatgaa	180
ggcacacaag gagactcctg gaacactgat gctggtgaat gtgcaagggg tcgaggagga	240
agaggcagag ggagaggagg attttaaagc tcatactctt cagggtggaga tgggaatgat	300
ggggacaaat ggaacaatgc aggaggagaa agagggtggt tcagaggtag aggcggccaa	360
gggcgtggca gaggatttgg aagaacagat cacagtgaag tcaatggaga cgacagtgga	420
gtgtgtgaaa acgggtttcg aggaggcaga gggggtagag gaaggaggag aagtttcagt	480
caaggtcggg actcgggtgg cagaggaggc tttggaggag gttatcgtgg aaaagatgaa	540
gagatctttt ctcaagggga agataaagat caagacaaga aggatgacag tgagagacca	600
aaggtcacgt atgtgcccc cacactccct gaagatgaag actcaatttt tccccattat	660
gaaacgggga tcaactttga caagtatgat gatatcatgg tggatgttag tggaaccaat	720
ccaccacaag ctatcatgac tttttagtag gcgcaattgt gcgagtccct gaaaaaaat	780
gtcagcaagt ctggttatgt gaagccgacc ccagtgcaga aacatggcat tccaatcatc	840
tctgctggca gagatctcat ggcctgtgcc cagactggat ctggtaaaac ggctgcattc	900
ctgctcccta ttctgcagca gctgatggca gatggtgttg cagccagtcg cttcagttag	960
ctgcaggagc ctgaagcaat tattgtggcc ccaacaaggg agctcatcaa ccagatttac	1020
ctggaggcta ggaagtttgc ctttgggaca tgtgtgcgtc ctgtggtggt ttatggtgga	1080
gtcagcactg gacaccaaat aagagacatt gaaaggggat gcaatatagt gtgtggaaca	1140
ccaggcaggc tattggatat gattggtaga ggaaagggtg gggtagtaa gctgcggtac	1200
ctagtccctag atgaggctga ccggtatgtg gatatgggat ttgagcctga tatgcgccgc	1260
ttggtgggct cacctggaat gccatccaaa gagaaccgtc agactcttat gttcagtgtc	1320
acgtacctg aggacataca gaggatggct gctgacttcc tgaagaccga ctatttgttc	1380
ctggctgtgg gtgtggtggg tggagcctgc agtgatgtgg agcagacgtt tatccaagtc	1440
accaagttct ccaagagaga gcaacttctt gacctcctga agaccactgg aatggagcgc	1500
accatggtgt ttgtggagac caagagacaa gctgatttta tcgccacgtt cttgtgccag	1560
gagaaagttc caaccactag cattcatggt gatcgagagc agcgggagcg agagcaagct	1620
ctggcagact tccgctctgg taaatgtcca gtcatggtgg caacctctgt agctgccgt	1680
ggtctggata ttccagatgt acagcatgtg gtgaactttg acctcccaa caacattgat	1740
gaatatgttc accgtattgg gagaactggc cgctgcggtg atactgggag ggcagtgtct	1800
ttctatgacc ctgatggtga tagccaactg gctagctcct tggtcacagt cctgtccaag	1860
gcccagcagg aagtgccttc atggttagaa gagtctgcgt tcagcggatc tacttctct	1920
agcttcaaac caccaggaa gaactttgcc tccacagact ccaggaaggg aggatctttc	1980
caagacaaca gtatgcagag ccaggaggct gttcagcctg ctgccaatga tgatgatgaa	2040
gaatgggaat agaagaacag cacaaccaca cagcaatgac ctgagttact ttttattttc	2100
aggtgttcag cttctttag ttttatcaca gtgtttttgt tggaatatta aaaaagtttc	2160
ttgtcagaca aagtttaaaa tgctaagtga gatggtaaat ggcgaaacca gttttttgt	2220
ttttgtatga tctgtcttct ccattcactg actggcactt tgtgaacatt tttttttct	2280
tttttattgt tttaatcatc acttacattt aaagtgttta aaaaagtaaa caatgtgtct	2340
gatggcaaaa agcaaaactt ttgaaatgtc atatattttg ttttctacga ggataaagat	2400
aaataaatat ttgttctaag caaaaaaaaa aaaaa	2435

<212> PRT

<213> Scomber australasicus

<400> 6

5

```

Met Asp Glu Trp Glu Glu Gly Thr Val Ser Thr Ile Pro Leu Thr
 1      5      10      15

Ser Tyr Thr Pro Asn Glu Gly Thr Gln Gly Asp Ser Trp Asn Thr Asp
      20      25      30

Ala Gly Glu Cys Ala Arg Gly Arg Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
      35      40      45

Gly Phe Lys Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Gly Asp Gly Asn Asp Gly Asp
 50      55      60

Lys Trp Asn Asn Ala Gly Gly Glu Arg Gly Gly Phe Arg Gly Arg Gly
 65      70      75      80

Gly Gln Gly Arg Gly Arg Gly Phe Gly Arg Thr Asp His Ser Glu Val
      85      90      95

Asn Gly Asp Asp Ser Gly Val Cys Glu Asn Gly Phe Arg Gly Gly Arg
      100      105      110

Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Phe Ser Gln Gly Arg Asp Ser Gly
      115      120      125

Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Gly Tyr Arg Gly Lys Asp Glu Glu Ile
      130      135      140

Phe Ser Gln Gly Glu Asp Lys Asp Gln Asp Lys Lys Asp Asp Ser Glu
      145      150      155      160

Arg Pro Lys Val Thr Tyr Val Pro Pro Thr Leu Pro Glu Asp Glu Asp
      165      170      175

Ser Ile Phe Ser His Tyr Glu Thr Gly Ile Asn Phe Asp Lys Tyr Asp
      180      185      190

Asp Ile Met Val Asp Val Ser Gly Thr Asn Pro Pro Gln Ala Ile Met

```

195	200	205
Thr Phe Asp Glu Ala Gln Leu Cys Glu Ser Leu Arg Lys Asn Val Ser	210	215 220
Lys Ser Gly Tyr Val Lys Pro Thr Pro Val Gln Lys His Gly Ile Pro	225	230 235 240
Ile Ile Ser Ala Gly Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala Gln Thr Gly Ser	245	250 255
Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Gln Gln Leu Met Ala	260	265 270
Asp Gly Val Ala Ala Ser Arg Phe Ser Glu Leu Gln Glu Pro Glu Ala	275	280 285
Ile Ile Val Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ile Asn Gln Ile Tyr Leu Glu	290	295 300
Ala Arg Lys Phe Ala Phe Gly Thr Cys Val Arg Pro Val Val Val Tyr	305	310 315 320
Gly Gly Val Ser Thr Gly His Gln Ile Arg Asp Ile Glu Arg Gly Cys	325	330 335
Asn Ile Val Cys Gly Thr Pro Gly Arg Leu Leu Asp Met Ile Gly Arg	340	345 350
Gly Lys Val Gly Val Ser Lys Leu Arg Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala	355	360 365
Asp Arg Met Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Asp Met Arg Arg Leu Val	370	375 380
Gly Ser Pro Gly Met Pro Ser Lys Glu Asn Arg Gln Thr Leu Met Phe	385	390 395 400
Ser Ala Thr Tyr Pro Glu Asp Ile Gln Arg Met Ala Ala Asp Phe Leu	405	410 415
Lys Thr Asp Tyr Leu Phe Leu Ala Val Gly Val Val Gly Gly Ala Cys	420	425 430
Ser Asp Val Glu Gln Thr Phe Ile Gln Val Thr Lys Phe Ser Lys Arg	435	440 445
Glu Gln Leu Leu Asp Leu Leu Lys Thr Thr Gly Met Glu Arg Thr Met	450	455 460
Val Phe Val Glu Thr Lys Arg Gln Ala Asp Phe Ile Ala Thr Phe Leu		

[illegible]

<210> 7
<211> 2361
<212> ADN
<213> Euthynnus affinis

<400> 7

accagacggc	ttagtgacca	gacggagaac	gacgacttct	gcggaggagc	ttttgataag	60
ttaacaaaa	tggatgagtg	ggaagaagag	ggaaccgtta	gtactattcc	attaaccagc	120
tacacctcga	atgaaggcac	acaaggagac	tcctggaaca	ctgatgctgg	tgaatgtgca	180
aggggtcgcg	gaggaagagg	cagagggaga	ggaggattta	aaagctcata	ctcttcaggt	240
ggagatggga	atgatgggga	caaatggaac	aatgcaggag	gagaaagagg	tggtttcaga	300
ggtagaggcg	gccaaaggcg	tggcagagga	tttggaagaa	cgatcacag	tgaagtcaat	360
ggagacgaca	gtggagtatg	tgaaaacggg	tttcgaggag	ggagaggggg	tagaggaaga	420
ggaggaagtt	tcagtcaagg	tcgggactcg	ggtggcagag	gaggctttgg	aggaggttat	480

```

cgtggaaaag atgaagagat cttttctcaa ggggaagata aagatcaaga caagaaggat 540
gacagtgaga gaccaaaggt cacgtatgtg cccccacac tccctgaaga tgaagactca 600
gttttttccc attatgaaac ggggatcaac tttgacaagt atgatgatat catggtggat 660
gttagtggaa ccaatccacc acaagctatc atgacttttg atgaggcgca attgtgcbag 720
tccctgagaa aaaatgtcag caagtctggt tatgtgaagc cgacccagc gcagaaacat 780
ggcattccaa tcatctctgc tggcagagat ctcatggcct gtgcccagac tggatctggt 840
aaaacggctg cattcctgct ccctattctg cagcagctga tggcagatgg tgtggcagcc 900
agtcgcttca gcbagctgca ggagcctgaa gccatcattg tggccccaac caggagctc 960
atcaaccaga tttacctgga agccaggaag tttgcctttg ggacatgtgt gcgtccagtg 1020
gtggtttatg gtggagtcag cactggacac caaataagag aaatctcaag gggatgcaat 1080
gtagtgtgtg gaacacctgg gaggtctattg gatatgattg gaagaggaaa ggttgggttg 1140
actaagctgc ggtacctggt gctagatgag gccgacagga tgttggatat gggatttgag 1200
cctgacatgc gccggctggt gagctcacct ggaatgccat ccaaagagaa ccgtcagaca 1260
ctgatgttca gtgccacgta ccctgaagac atccagaggt tggcagctga cttcctcaag 1320
accgactatt tgttctctggc tgtgggtgtg gtgggtggag cctgcagtg tgtggagcag 1380
acatttatcc aagtaacaaa gttctccaag agagagcagc tccttgacct cctgaagacc 1440
actggaatgg agcgcacat ggtgtttgtg gagaccaac gacaagctga ttttattgcc 1500
actttcttgt gccagagaa agttccaact accagcattc atggtgacag agagcagcgg 1560
gagagagagc aggtctctggc agacttccgc tccggtaaat gtcccgtcct agtggcaaca 1620
tctgtagctg cccgcggtct ggatattcca gatgtgcagc atgtggtgaa ctttgacctc 1680
cccaacaaca ttgatgaata tgtccaccgt attgggagaa ccggccgctg cggtaacact 1740
gggagggcag tgtcttttta tgacctgat gctgatggcc aactggctcg ctcttggtc 1800
acggtcctgt ccaaggccca gcaggaagtg cttcatggt tagaagagtc tgcattcagt 1860
ggacctgctg tcaccagctt caacccatcc aggaagacct ttgcctccac agactccagg 1920
aagggaggat ctctccaaga caacagtgtg aagagccagc cggctgttca cactgcagct 1980
gatgatgagg aggaatggga atagaagagc agcgcacca cacagcattg acctgaatta 2040
ctttttattt tcaggcgttc agtttattgt agttttatca cgtttttgtt tgaatataca 2100
agaaaagttt aaaatgtcaa gtgagatgtt aaatggggag accagttttt ttgtgtgatc 2160
tgtcatttcc attcactgac tggcattttg tgaagtttgt tttatttttt attgttttaa 2220
tcatcacttg catttaaaat gtttaaaaaa ggaaacaatg tgtcgaccaa aaaagtaaaa 2280
cttataaatg tcaactatat tttgttttct actttgataa caatcaataa atatttgttc 2340
aaagcaaaaa aaaaaaaaaa a 2361

```

5 <210> 8
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Euthynnus affinis

 <400> 8

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

Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Gln Gln Leu Met Ala
 260 265 270
 Asp Gly Val Ala Ala Ser Arg Phe Ser Glu Leu Gln Glu Pro Glu Ala
 275 280 285
 Ile Ile Val Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ile Asn Gln Ile Tyr Leu Glu
 290 295 300
 Ala Arg Lys Phe Ala Phe Gly Thr Cys Val Arg Pro Val Val Val Tyr
 305 310 315 320
 Gly Gly Val Ser Thr Gly His Gln Ile Arg Glu Ile Ser Arg Gly Cys
 325 330 335
 Asn Val Val Cys Gly Thr Pro Gly Arg Leu Leu Asp Met Ile Gly Arg
 340 345 350
 Gly Lys Val Gly Leu Thr Lys Leu Arg Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala
 355 360 365
 Asp Arg Met Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Asp Met Arg Arg Leu Val
 370 375 380
 Ser Ser Pro Gly Met Pro Ser Lys Glu Asn Arg Gln Thr Leu Met Phe
 385 390 395 400
 Ser Ala Thr Tyr Pro Glu Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Asp Phe Leu
 405 410 415
 Lys Thr Asp Tyr Leu Phe Leu Ala Val Gly Val Val Gly Gly Ala Cys
 420 425 430
 Ser Asp Val Glu Gln Thr Phe Ile Gln Val Thr Lys Phe Ser Lys Arg
 435 440 445
 Glu Gln Leu Leu Asp Leu Leu Lys Thr Thr Gly Met Glu Arg Thr Met
 450 455 460
 Val Phe Val Glu Thr Lys Arg Gln Ala Asp Phe Ile Ala Thr Phe Leu
 465 470 475 480
 Cys Gln Glu Lys Val Pro Thr Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Glu Gln
 485 490 495
 Arg Glu Arg Glu Gln Ala Leu Ala Asp Phe Arg Ser Gly Lys Cys Pro
 500 505 510
 Val Leu Val Ala Thr Ser Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Pro Asp
 515 520 525

Val Gln His Val Val Asn Phe Asp Leu Pro Asn Asn Ile Asp Glu Tyr
530 535 540

Val His Arg Ile Gly Arg Thr Gly Arg Cys Gly Asn Thr Gly Arg Ala
545 550 555 560

Val Ser Phe Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Gly Gln Leu Ala Arg Ser Leu
565 570 575

Val Thr Val Leu Ser Lys Ala Gln Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu
580 585 590

Glu Ser Ala Phe Ser Gly Pro Ala Val Thr Ser Phe Asn Pro Ser Arg
595 600 605

Lys Thr Phe Ala Ser Thr Asp Ser Arg Lys Gly Gly Ser Leu Gln Asp
610 615 620

Asn Ser Val Lys Ser Gln Pro Ala Val His Thr Ala Ala Asp Asp Glu
625 630 635 640

Glu Glu Trp Glu

<210> 9
<211> 2370
<212> ADN
<213> Nibea mitsukurii

<400> 9

ttcgccgagc tcttcttgag aagtacaagt tcacgagttg aacaaaatgg acgactggga	60
agaaggggaa gccgctagta ctgccgcgct gaccggccgc aacccaactg aaggcacaca	120
aggaggctcc tggaatactt tcagcggcga atttggaagg ggtcgcggtg ggagaggcag	180
agggggagggc tttaaagccg cgttctcttc aggcacggat gagaacgcga acggggacga	240
cggggacaac tggaacaaca cagaagggga acgaggtggt ttcagaggta gaggtggcag	300
aggccgtggc aggggattcg gcaggacgga tcgcagcgaa ttcagtggag aggacggcgt	360
gtgcgaaaac ggctttagag gagggagcag aggaggaaga ggaggcagag gaggaggagg	420
aggtttcaga tcaggtgatg accaggggtg cagaggaggc tttggaggag ggaagacaa	480
agaaaataag gatggaagcg atggtgaccg accccgggtc acgtacattc ccccgaccct	540
gcctgaagac gaagacacca tttttgccca ctataagacg ggcatcaact ttgacaagta	600
tgacgacatc atggtggatg tgagcggaac caatgcgcca caggctatca tgacctttga	660
agaggcaaca ctgtgcgagt ccctgagaaa agccgtcgcc aagtctggct acgtgaagcc	720
gaccctgtg cagaagcacg ggatcccgat catctctgct ggcagagatc tcatggcctg	780
cgctcagacc ggatctggta aaacggctgc gttcctgctc cccattctgc agcagctgat	840
ggcggacggc gtggcagcca gtccttcag cgagctgcag gagcctgaag tcctcatcgt	900

```

ggccccaacc agggagctca tcaaccagat ttacatggag gcccggaagt tctcctatgg 960
gacatgcgtg cgtccagtag tggtttatgg cggagtttagc accggatacc aaatacggga 1020
aatctcacgg gggatgcaatg tgctgtgtgg aacaccgggg agactgttgg acgtgattgg 1080
aagaggaaag attggcttga gcaagctgcg gtactttgtg ctggacgagg ctgaccgcat 1140
gttggacatg ggcttcgaac cggacatgcg ccgtttgggt ggctcccccg gcatgccgac 1200
caaagagcac cgccagaccc tgatgttcag tgccacgtac cccgaggaca tccagaggat 1260
ggctgctgac ttcctgaaga ccgactattt gttcttggcc gtgggtgtgg tgggcggagc 1320
ctgcagtgac gtggagcaga cttttgtcca agtcacaaag ttctccaaga gggagcaact 1380
cctcgacctc ctgaagacaa ctggaacgga gcgcaccatg gtgtttgtgg agaccaagag 1440
gcaagctgat ttcattcgca cgtacctgtg ccaggagaaa gtccaacaa ccagcattca 1500
tggcgaccgt gagcagcgcg agcgggagca ggctctggcg gacttccgct ccggcaagtg 1560
tccggtcctg gtggcgacct ccgtagctgc ccgcggcctg gatgttcccg acgtactgaa 1620
cgtagtgagc tttgacctcc ccaacaacat cgacgaatat gtccaccgca ttgggaggac 1680
cggccgctgc gggaaactg gcagagccgt gtctttctat gaccagatg ctgatgggca 1740
gctggctcgc tcgctcgtca caatcctgtc caaggccag caggaagtgc cctcgtggtt 1800
agaagagtat gcgttcagcg tcccgggtga cgcgggcttc aactcctcca agaggaactt 1860
tgctcctca gactccagga agggcatca tggaggatct tttcaggaca acggtgagc 1920
gagccagccg gccgctcagg ccgcggctga cgacgatgac tgggagtaga ggggatatga 1980
acagcagacc gccacacatc cgtgacctga gttgtttttc ttggcagggtg tccagcttgt 2040
tgccgtttta ttatcacagt gtttttgttt aaaaaggagg aaaaacgtgt ttgcctcaag 2100
gccgtacgaa atttaaaaaa aaaaaacgtc ccgtgagacg ttaaactgtg gaaccagtga 2160
caacttttca gtcttactg agcagcagat tgtgtaaagt tagtttttta tttattttt 2220
ttatcacttg catgtaacgt gatgaaggaa aacaatggac cctgaccaga ggtcaaacat 2280
ggaaggctgt tatattccaa ctcttaattt gtttcctgtg agcatgaaaa ttaataaata 2340
cgtaatttgt tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2370

```

<210> 10
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> Nibea mitsukurii

<400> 10

```

Met Asp Asp Trp Glu Glu Gly Glu Ala Ala Ser Thr Ala Ala Leu Thr
1          5          10          15

Gly Arg Asn Pro Thr Glu Gly Thr Gln Gly Gly Ser Trp Asn Thr Phe
20          25          30

Ser Gly Glu Phe Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gly Gly

```

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

305		310		315		320
Tyr Gln Ile Arg	Glu 325	Ile Ser Arg Gly	Cys 330	Asn Val Leu Cys	Gly 335	Thr
Pro Gly Arg	Leu 340	Leu Asp Val Ile	Gly 345	Arg Gly Lys Ile	Gly 350	Leu Ser
Lys Leu Arg	Tyr 355	Phe Val Leu Asp	Glu 360	Ala Asp Arg	Met 365	Leu Asp Met
Gly Phe Glu	Pro 370	Asp Met Arg	Arg 375	Leu Val Gly	Ser 380	Pro Gly Met Pro
Thr Lys Glu	His 385	Arg Gln Thr	Leu 390	Met Phe Ser	Ala 395	Thr Tyr Pro Glu 400
Asp Ile Gln	Arg 405	Met Ala Ala Asp	Phe 410	Leu Lys Thr	Asp Tyr	Leu Phe 415
Leu Ala Val	Gly 420	Val Val Gly	Gly 425	Ala Cys Ser	Asp Val	Glu Gln Thr 430
Phe Val Gln	Val 435	Thr Lys Phe	Ser 440	Lys Arg Glu	Gln 445	Leu Leu Asp Leu
Leu Lys Thr	Thr 450	Gly Thr Glu	Arg 455	Thr Met Val	Phe 460	Val Glu Thr Lys
Arg Gln Ala	Asp 465	Phe Ile Ala Thr	Tyr 470	Leu Cys Gln	Glu 475	Lys Val Pro 480
Thr Thr Ser	Ile 485	His Gly Asp	Arg 490	Glu Gln Arg	Glu 495	Arg Glu Ala
Leu Ala Asp	Phe 500	Arg Ser Gly	Lys 505	Cys Pro Val	Leu 510	Val Ala Thr Ser
Val Ala Ala	Arg 515	Gly Leu Asp	Val 520	Pro Asp Val	Leu 525	Asn Val Val Ser
Phe Asp Leu	Pro 530	Asn Asn Ile	Asp 535	Glu Tyr Val	His 540	Arg Ile Gly Arg
Thr Gly Arg	Cys 545	Gly Asn Thr	Gly 550	Arg Ala Val	Ser 555	Phe Tyr Asp Pro 560
Asp Ala Asp	Gly 565	Gln Leu Ala	Arg 570	Ser Leu Val	Thr 575	Ile Leu Ser Lys
Ala Gln Gln	Glu 580	Val Pro Ser	Trp 585	Leu Glu Glu	Tyr 590	Ala Phe Ser Val

ES 2 401 724 T3

		580		585		590	
		Pro Gly Asp Ala Gly Phe Asn Ser Ser Lys Arg Asn Phe Ala Ser Ser					
		595		600		605	
		Asp Ser Arg Lys Gly His His Gly Gly Ser Phe Gln Asp Asn Gly Ala					
		610		615		620	
		Thr Ser Gln Pro Ala Ala Gln Ala Ala Ala Asp Asp Asp Asp Trp Glu					
		625		630		635	640
5		<210> 11					
		<211> 26					
		<212> ADN					
		<213> Secuencia artificial					
10		<220>					
		<223> cebador					
		<220>					
		<221> misc_feature					
		<222> (1)..(26)					
		<223> n indica cualquiera					
15		<400> 11					
		tayrwbaagc cbacncchgt ncagaa					26
20		<210> 12					
		<211> 26					
		<212> ADN					
		<213> Secuencia artificial					
25		<220>					
		<223> cebador					
		<220>					
		<221> misc_feature					
		<222> (1)..(26)					
30		<223> n indica cualquiera					
		<400> 12					
		tchtcddgggw angtrgcrcr gaacat					26
35		<210> 13					
		<211> 25					
		<212> ADN					
		<213> Secuencia artificial					
40		<220>					
		<223> cebador					
		<400> 13					
45		tggcaaactt cctggcctcc aggta					25
		<210> 14					
		<211> 25					
		<212> ADN					
		<213> Secuencia artificial					
50		<220>					
		<223> cebador					
		<400> 14					
55		tctaccaggg agctcatcaa ccaga					25

	<210> 15		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 15		
10	tccaccatga tgcatcata cttgtcaa	28	
	<210> 16		
	<211> 25		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
20	<400> 16		
	tgcaactcag gtcaatgctg tgtgg	25	
	<210> 17		
	<211> 1090		
25	<212> ADN		
	<213> Atún de aleta azul		
	<400> 17		
	agggagctca tcaaccagat ttacctggag gccaggaagt ttgcctttgg gacatgtgtg	60	
	cgtccagtggtg tggtttatgg tggagtcagc actggacacc aaataagaga aatcgaaagg	120	
	ggatgcaatg tagtgtgtgg aacaccaggg aggcatttgg atatgattgg aagaggaaag	180	
	gttgggttga gtaagctgctg gtacttggtg ctagatgagg ccgaccggat gttggatatg	240	
	ggattttgagc ctgacatgctg ccgcctgggtg ggctcacctg gaatgccatc caaagagaac	300	
	cgtcagactc tgatgttcag tgccacatac cctgaagaca tccagaggat ggcggctgac	360	
	ttcctcaaga cagactatct gttcctggct gtgggtgtgg tgggtggagc ctgcagtgat	420	
	gtggagcaga catttatcca agtcacaaag ttctccaaga gagagcagct ccttgacctc	480	
	ctgaagacca ctggaacgga gcgcaccatg gtgtttgtag agaccaaacg acaagctgat	540	
	tttattgcca cgttcttggg ccaagagaaa gttccaacta ccagcattca cggtgaccga	600	
	gagcagcggg agcgagagca ggctctggca gacttccgct ctggtaaagt tccagtccta	660	
	gtagcaacct ctgtagctgc ccgcgggtctg gatattccag atgtacagca tgtgggtaac	720	
	tttgacctcc ccaacaacat tgatgaatat gtccaccgta ttgggaggac tggccgctgc	780	
	ggtaacacag ggagggcagt gtctttctat gaccctgatg ctgatggcca actggctcgc	840	
	tccttggtca cagtcctgtc caaggcccag caggaagtgc cttcatgggt agaagagtct	900	
30	gcgttcagcg gacctgctac cactggcttt aaccaccta ggaagaactt tgcctccaca	960	
	gactccagga agagaggatc tttccaagac aacagtgtga agagccagcc ggctgttcag	1020	
	actgcagcgg atgatgatga ggaatgggaa tagaggagca gcacaccac acagcattga	1080	
	cctgagttgc	1090	
	<210> 18		
35	<211> 1267		
	<212> ADN		
	<213> Nibea mitsukurii		

<400> 18

```
tattgctccg ctggacggga tctaattggcc tgcgctcaga ccggatctgg taaaacggct    60
gcgttcctgc tccccattct gcagcagctg atggcggacg gcgtggcagc cagctccttc    120
agcgagctgc aggagcctga agtcctcgtc gtggcccca ccaggagct catcaaccag    180
atttacatgg agggccggaa gttctcctat gggacatgcg tgcgtccagt agtggtttat    240
ggcggagtta gcaccggata ccaaatacgg gaaatctcaa gggggtgcaa tgtgctgtgt    300
ggaacaccgg ggagactggt ggacgtgatt ggaagaggaa agattggctt gagcaagctg    360
cggctacttg tgctggacga ggctgaccgc atgttggaca tgggcttcga accggacatg    420
cgccgtctgg tgggtcccc cggcatgccg accaaagagc accgccagac cctgatgttc    480
agtgccacgt accccgagga catccagagg atggctgctg acttcctgaa gaccgactat    540
ttgttcttgg ccgtgggtgt ggtgggcgga gcctgcagt acgtggagca gacatttgct    600
caggtcacia agttctccaa gagggagcaa ctctcgacc tcctgaagac aactgggaac    660
ggagcgcacc atggtgtttg tggagaccaa gaggcaagct gatttcacgc cgacgtacct    720
gtgccaggag aaagtcccaa caaccagcat tcatggcgac cgtgagcagc gcgagcggga    780
gcaggctctg gcggacttcc gctccggcaa gtgtccggtc ctggtggcga cctccgtagc    840
tgcccgcggc ctggatgttc ccgacgtact gaacgtagt agctttgacc tccccaacia    900
catcgacgaa tatgtccacc gcattgggag gaccggccgc tgcgggaaca ctggcagagc    960
cgtgtctttc tatgaccag atgtgatgg gcagctggct cgctcgctc tcacaatcct   1020
gtccaaggcc cagcaggaag tgccctcgtg gttagaagag tatgcgttca gcgtcccggg   1080
tgacgcgggc ttcaactcct ccaagaggaa ctttgcctcc tcagactcca ggaagggcca   1140
tcatggagga tcttttcagg acaacggtgc gacgagccag ccggccgctc aggccgcggc   1200
tgacgacgat gactgggagt agaggggata tgaacagcag accgccacac atccgtgacc   1260
tgagttg                                     1267
```

5 <210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 19
atggtgtttg tagagaccaa acga 24

15 <210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 20
ccttgacag gactgtgacc aag 23

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

ES 2 401 724 T3

	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 21	
5	cgtctggat attccagatg taca	24
	<210> 22	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 22	
15	ttggacagga ctgtgaccaa ggag	24

REIVINDICACIONES

1. Proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2 en el listado de secuencias, que se expresa específicamente en una célula germinal de atún de aleta azul.
2. ADN codificante de una proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2 en el listado de secuencias, que se expresa específicamente en una célula germinal de atún de aleta azul.
3. ADN que está constituido por la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 1 en el listado de secuencias.
4. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 2 o 3.
5. Transformante no humano transformado con el vector recombinante según la reivindicación 4.
6. Sonda para detectar la presencia de un ADN o ARNm codificante de la proteína según la reivindicación 1, constituida por los (a) o (b) siguientes:
 - (a) un ADN que está constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 17 o una secuencia complementaria de la misma,
 - (b) un ARN complementario al ADN de (a), anterior.
7. Método para detectar una célula germinal primordial, un espermatogonio o un oogonio derivado del atún, que ha sido trasplantado en una corvina honnibe, comprendiendo dicho método la utilización de la sonda según la reivindicación 6.
8. Método para detectar una célula germinal primordial, un espermatogonio o un oogonio derivado de atún de aleta azul, que ha sido trasplantado en una corvina honnibe, caballa o bacoreta oriental, comprendiendo dicho método las etapas (A) a (C) siguientes:
 - (A) amplificar un fragmento de ADN mediante PCR anidada utilizando un primer juego de cebadores constituido por las secuencias de nucleótidos representadas por las SEC ID nº 19 y nº 20, y un juego de cebadores anidados constituido por las secuencias de nucleótidos representadas por las SEC ID nº 21 y nº 22,
 - (B) tratar el fragmento de ADN con un enzima de restricción HpaI; y
 - (C) determinar que el fragmento de ADN digerido se deriva del atún de aleta azul, y que el fragmento de ADN no digerido se deriva de una corvina honnibe, caballa o bacoreta oriental.

Figura 1

Detección de ARNm de Vasa de atún de aleta azul utilizando un método de hibridación in situ



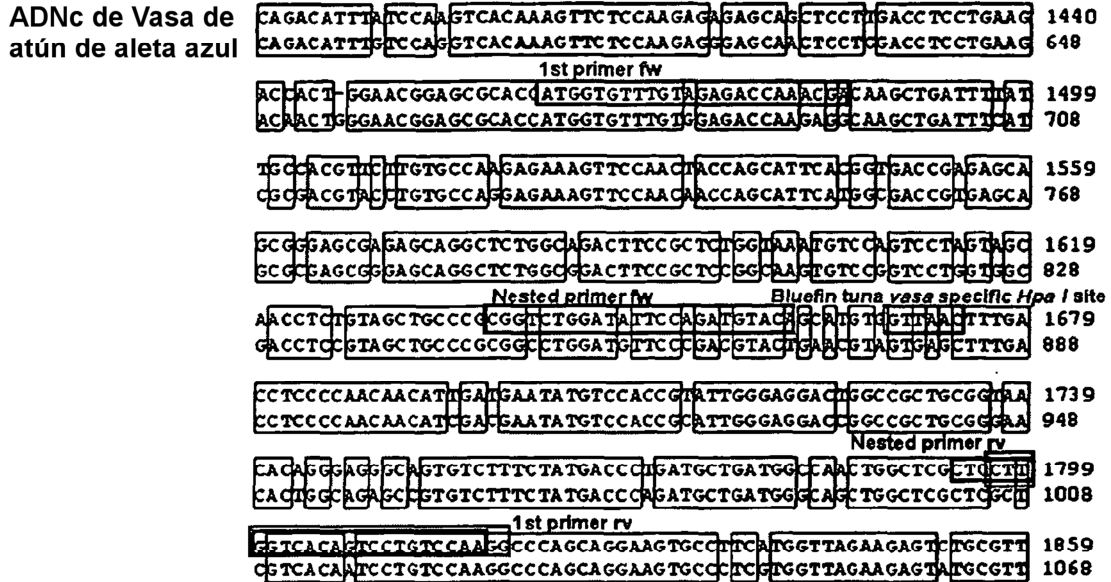
Figura 2

Diferencias de teñibilidad entre las células germinales de atún de aleta azul y células germinales de corvina honnibe, examinadas utilizando un método de hibridación in situ

	Sonda de ARN de gen Vasa de corvina honnibe	Sonda de ARN de gen Vasa de atún de aleta azul
Tejidos testiculares de corvina honnibe		
Tejidos testiculares de atún de aleta azul		

Figura 3

Sitios de reconocimiento de cebadores utilizados en la detección del ADNc de Vasa de atún y sitios de enzima de restricción



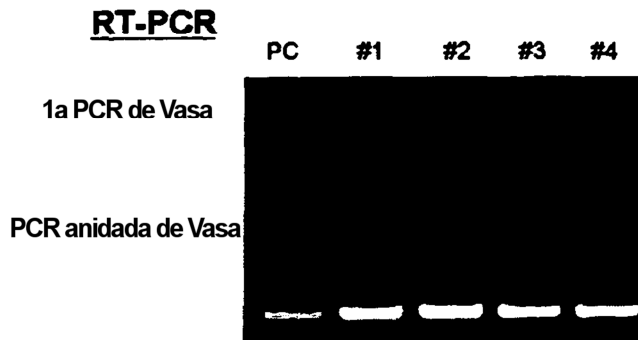
*Número de nucleótidos en fragmentos amplificados por PCR"

1a PCR **** 357 pb PCR anidada **** 179 pb

* Tras el tratamiento con HpaI, una secuencia de Vasa de atún (179 pb) queda dividida en un fragmento de 146 pb y uno de 33 pb.

Figura 4-1

Productos de PCR y tratamientos con enzimas de restricción utilizando ADNc como molde



PC: ADNc derivado de ovario de atún (10^6 células)

#1: ADNc derivado de ovario de atún (10^5 células) +ADNc derivado de ovario de corvina honnibe (10^6 células)

#2: ADNc derivado de ovario de atún (10^4 células) +ADNc derivado de ovario de corvina honnibe (10^6 células)

#3: ADNc derivado de ovario de atún (10^3 células) +ADNc derivado de ovario de corvina honnibe (10^6 células)

#4: ADNc derivado de ovario de atún (10^2 células) +ADNc derivado de ovario de corvina honnibe (10^6 células)

*Se obtienen los mismos resultados que los mostrados en la figura anterior incluso utilizando ADN genómico como molde

Figure 4-2

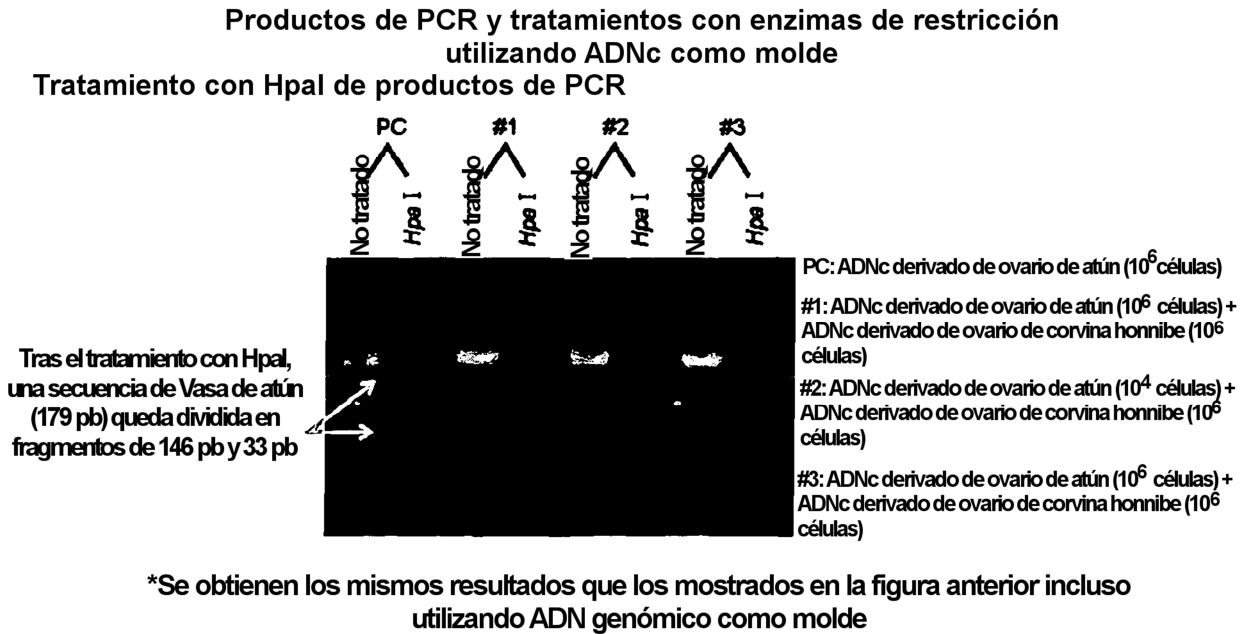


Figura 5

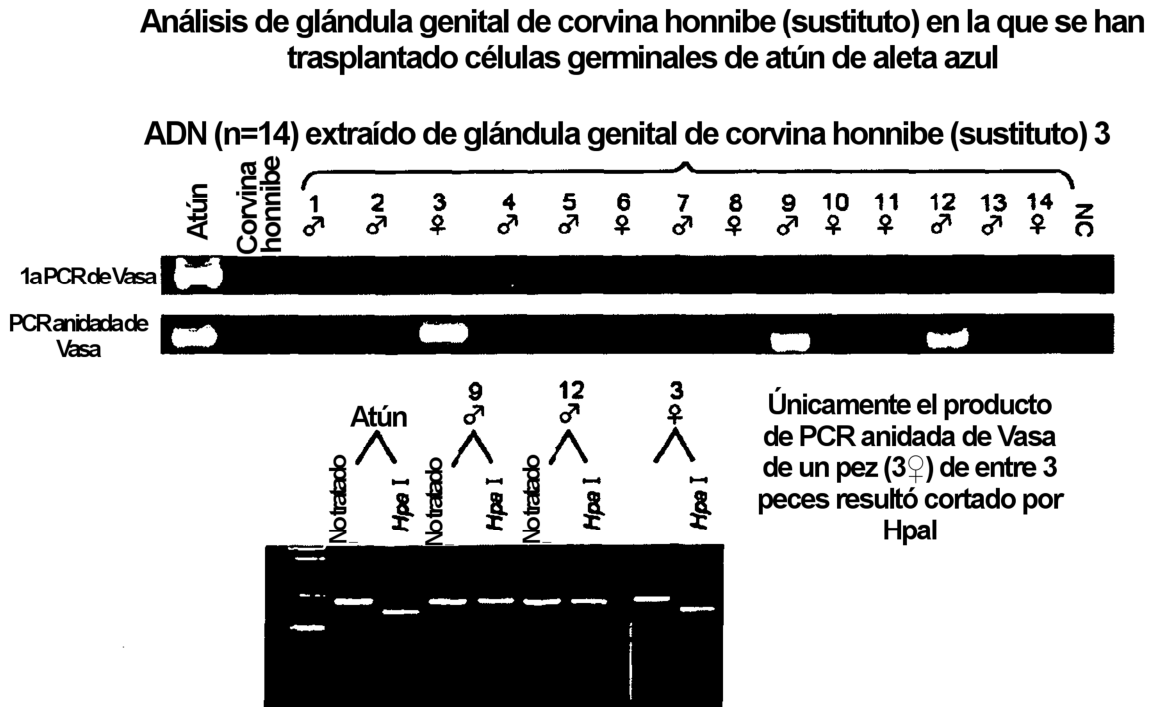


Figura 6 Corresponde a la posición en 1.070 pb de la longitud completa del ADNc de Vasa de atún de aleta azul

aleta azul	1:	ATGGTGTGTTGTGGAGACCAACCAAGCTGATTTTATTCGCACTTCTGTGTTCCAGAG	60
corvina	1:	ATGGTGTGTTGTGGAGACCAAGGCAAGCTGATTTTATTCGCACTTCTGTGTTCCAGAG	60
saba	1:	ATGGTGTGTTGTGGAGACCAACCAAGCTGATTTTATTCGCACTTCTGTGTTCCAGAG	60
suma	1:	ATGGTGTGTTGTGGAGACCAACCAAGCTGATTTTATTCGCACTTCTGTGTTCCAGAG	60
aleta azul	61:	AAAGTTCCAACCTACAGCATTCACTGGGACCGAGAGCAGGGGAGCGAGAGCAAGCTCTG	120
corvina	61:	AAAGTTCCAACCTACAGCATTCACTGGGACCGAGAGCAGGGGAGCGAGAGCAAGCTCTG	120
saba	61:	AAAGTTCCAACCTACAGCATTCACTGGGACCGAGAGCAGGGGAGCGAGAGCAAGCTCTG	120
suma	61:	AAAGTTCCAACCTACAGCATTCACTGGGACCGAGAGCAGGGGAGCGAGAGCAAGCTCTG	120
aleta azul	121:	GCAGACTTCCGCTCTGGTAAATGTCCAGTCTAGTAGCAACCTCTGTAGCTGCCCGCGT	180
corvina	121:	GCAGACTTCCGCTCTGGTAAATGTCCAGTCTAGTAGCAACCTCTGTAGCTGCCCGCGT	180
saba	121:	GCAGACTTCCGCTCTGGTAAATGTCCAGTCTAGTAGCAACCTCTGTAGCTGCCCGCGT	180
suma	121:	GCAGACTTCCGCTCTGGTAAATGTCCAGTCTAGTAGCAACCTCTGTAGCTGCCCGCGT	180
<i>Hpa</i> I			
aleta azul	181:	CTGGATATTCCAGATGTAAACATGTGTAACCTTGACCTCCCAACAACATTTGATGAA	240
corvina	181:	CTGGATATTCCAGATGTAAACATGTGTAACCTTGACCTCCCAACAACATTTGATGAA	240
saba	181:	CTGGATATTCCAGATGTAAACATGTGTAACCTTGACCTCCCAACAACATTTGATGAA	240
suma	181:	CTGGATATTCCAGATGTAAACATGTGTAACCTTGACCTCCCAACAACATTTGATGAA	240
aleta azul	241:	TATGTCACCGTATTGGGAGAACTGGCCGCTGCGGTAAACTGGGAGGCAATGTCTTTT	300
corvina	241:	TATGTCACCGTATTGGGAGAACTGGCCGCTGCGGTAAACTGGGAGGCAATGTCTTTT	300
saba	241:	TATGTCACCGTATTGGGAGAACTGGCCGCTGCGGTAAACTGGGAGGCAATGTCTTTT	300
suma	241:	TATGTCACCGTATTGGGAGAACTGGCCGCTGCGGTAAACTGGGAGGCAATGTCTTTT	300
aleta azul	301:	FATGACCTGATGCTGATGGCAACTGGCTCGTCTTTGGTCACAGTCTGTCCAAGG	360
corvina	301:	FATGACCTGATGCTGATGGCAACTGGCTCGTCTTTGGTCACAGTCTGTCCAAGG	360
saba	301:	FATGACCTGATGCTGATGGCAACTGGCTCGTCTTTGGTCACAGTCTGTCCAAGG	360
suma	301:	FATGACCTGATGCTGATGGCAACTGGCTCGTCTTTGGTCACAGTCTGTCCAAGG	360

Figura 7 PCR de Vasa de atún utilizando ovario de caballa pintoja y ovario de bacoreta oriental

