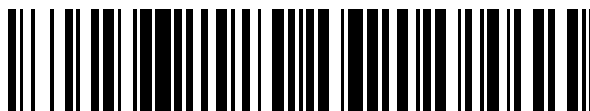


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 422**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2004** **E 04743590 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 1649027**

54 Título: **Sistemas de expresión para el control de insectos dañinos**

30 Prioridad:

28.07.2003 GB 0317656

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

12.03.2014

73 Titular/es:

**OXITEC LIMITED (100.0%)
71 MILTON PARK, ABINGDON
OXFORDSHIRE OX14 4RX, GB**

72 Inventor/es:

ALPHEY, LUKE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 447 422 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

Sistemas de expresión para el control de insectos dañinos

- 5 La presente invención se refiere a sistemas de expresión en insectos que comprenden un promotor.

La manipulación genética de insectos distintos de *Drosophila melanogaster*, por procedimientos de ADN recombinante está en su infancia (Alphey, 2002; Alphey y Andreassen, 2002; Alphey y col., 2002; Benedict y Robinson, 2003; Berghammer y col., 1999; Catteruccia y col., 2000; Coates y col., 1998; Handler, 2002; Horn y col., 2002; Jasinskiene y col., 1998; Lobo y col., 2002; Lozovsky y col., 2002; McCombs y Saul, 1995; Moreira y col., 2004; Pelloquin y col., 2000; Perera y col., 2002; Scott y col., 2004), y se han obtenido muy pocas líneas transgénicas de insectos no-*Drosophila*, utilizando promotores heterólogos.

- 15 La transformación de insectos es un sistema de baja eficacia que requiere la identificación de transformantes escasos, en un contexto con un gran número de individuos no transformados. Por tanto, es importante que los transformantes tengan un marcador fácilmente valorable. Actualmente los marcadores favoritos son las proteínas fluorescentes, tales como la GFP, DsRed y sus derivados mutantes. Estos requieren elementos de control de la transcripción, incluyendo un promotor, para su funcionamiento. Los mejor conocidos de estos son los genes de la *Drosophila* Actin5C (Act5C) y ubi-p63E (Pub). También se ha utilizado una seda de polilla homóloga de Act5C, el BmA3, así como un par de promotores específicos de tejido (3xP3, un promotor sintético específico de ojo, y Act88F, específico de los músculos indirectos de vuelo).

- 25 Sin embargo, ninguno de estos promotores es satisfactorio completamente. El Act5C se ha utilizado para transformar varios mosquitos, así como *Drosophila*, pero su patrón de expresión en mosquitos está lejos de ser ubicuo (Catteruccia y col., 2000; Pinkerton y col., 2000). Los esfuerzos para utilizarlo como parte de un marcador de transformación en la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*) han fallado, donde los experimentos con Pub habían conseguido un buen resultado. El Pub tiene limitaciones similares: el patrón de expresión que se ha visto en los transformantes de la mosca mediterránea de la fruta es muy variable, sugiriendo que el patrón de expresión es al menos muy sensible al efecto de posición. Además, ninguno de estos promotores se puede regular en un sentido o
- 30 activarse o desactivarse si se desea.

- Fussenegger y col., (1998a; 1998b) ilustra una retroalimentación positiva que controla transcripciones multicistricas, utilizando un marcador de selección, en un ejemplo. Los experimentos se restringieron a sistemas mamíferos. Se describe el pTRIDENT como un operón artificial mamífero tricistrico. Se ha descrito la expresión o la expresión transitoria de genes del ciclo celular detenidos para "manipulación metabólica", es decir, que regulan la expresión de proteínas deseadas, y se menciona que un efecto de "silenciamiento" del dominio transactivador VP16 puede ser letal para la célula huésped, incluso a niveles de expresión moderados (Berger y col., 1990; Damke y col., 1995; Gill y Ptashne, 1988; Gossen y Bujard, 1992; Salghetti y col., 2001). Se han tratado los beneficios de los sistemas autorreguladores mono o policistricos, incluyendo los sistemas de expresión multicistricos selectivos de mamíferos que incluyen el tTA en una configuración basada en pTRIDENT o una configuración tetracistrica (pQuatro-tTA; Fussenegger y col., (1998b); Figura 2). Aunque el gen tTA se codifica en la unidad de expresión multicistrica por sí misma, no se expresa o se expresa poco tTA bajo condiciones de restricción. Este sistema de regulación por retroalimentación positiva no muestra signos de silenciamiento. Los experimentos con una configuración monocistrica de retroalimentación positiva en animales transgénicos, tampoco ha mostrado efectos perjudiciales (Shockett y col., 1995).

- Se han caracterizado muy pocos promotores u otros elementos de control, y existe una necesidad acuciante para tales elementos. Sería deseable proporcionar un promotor universal activo en todas o casi todas las células de un amplio intervalo de insectos, o que fuera capaz de una utilización más amplia que un promotor existente. Una pretensión más es regular la actividad de los promotores de insectos, especialmente en una manera de estadio de vida y/o específica de sexo. También se pretende reducir o eliminar selectivamente la actividad del promotor en células o tejidos particulares. La presente invención proporciona tales sistemas.

- 50 Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que es posible emplear un mecanismo de retroalimentación positiva tanto para mejorar el efecto de un promotor de insectos, así como para controlar su expresión.

- Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un sistema de expresión génica de insectos, que comprende al menos un gen que hay que expresar y al menos un promotor del mismo, en el que el producto del gen que hay que expresar sirve como factor de control positivo de la transcripción para al menos un promotor, y que es controlable por el producto, o la expresión del producto.

- Como se utiliza en el presente documento, el término "gen" se refiere a cualquier secuencia de ADN que se pueda transcribir o traducir en un producto, al menos uno de los cuales tiene una actividad o función in vivo. Tal gen normalmente tendrá al menos un promotor de transcripción y un terminador asociado operativamente con él.

- El producto capaz del control positivo de la transcripción puede actuar de cualquier manera adecuada. En particular, el producto se puede unir a un potenciador localizado en las proximidades del promotor o promotores, sirviendo de esta manera para mejorar la unión de la polimerasa al promotor, por ejemplo. Se pueden emplear otros mecanismos, tales como contra un represor de los mecanismos, tal como el bloqueo de un inhibidor de la transcripción o la traducción. Los inhibidores de la transcripción se pueden bloquear, por ejemplo, utilizando ARN en horquilla o ribozimas para bloquear la traducción del ARNm que codifica el inhibidor, por ejemplo, o el producto se puede unir al inhibidor directamente, previniendo de esta manera la inhibición de la transcripción o la traducción.
- Más preferentemente, el mecanismo es un mecanismo de retroalimentación positiva, en el que el producto, que puede ser el ARN o el producto de la traducción del mismo, actúa en el sitio del potenciador de la transcripción, normalmente uniéndose al sitio, y así aumentando la actividad promotora. El aumento de la actividad promotora sirve entonces para incrementar la transcripción del gen para el producto, que a su vez, además sirve para elevar la inhibición o mejorar la promoción, llevando de esta manera a un bucle de retroalimentación positiva.
- El control del producto puede ser por cualquier medio adecuado, y puede efectuarse a cualquier nivel. Se prefiere que el control sea eficaz bien para bloquear la transcripción del gen de factor de control o para bloquear la traducción del producto ARN del mismo, o para prevenir o inhibir la acción de la traducción del producto del gen.
- Por ejemplo, el producto del gen tTA (activador de transcripción que se reprime en presencia de tetraciclina) actúa en la secuencia del operador tetO (Baron y Bujard, 2000; Gossen y col., 1994; Gossen y Bujard, 1992). Corriente arriba de un promotor, en cualquier orientación, cuando el tetO se une al producto del gen tTA, es capaz de aumentar los niveles de transcripción a partir de un promotor que esté muy próximo al mismo. Si el gen tTA es parte del casete que comprende el operador tetO junto con el promotor, se produce entonces la retroalimentación positiva cuando se expresa el producto génico del tTA.
- El control de este sistema se consigue fácilmente por exposición a la tetraciclina, la cual se une al producto génico e impide la transactivación del tetO.
- El sistema tTA también tiene la ventaja de proporcionar una toxicidad específica del estadio en varias especies. En particular, se observa el "silenciamiento" en las fases de desarrollo de muchos insectos, siendo la fase precisa de los insectos susceptibles dependiente de la especie. Algunos insectos pueden alcanzar el estadio de pupa antes de que muera la larva, mientras que otros mueren antes. La susceptibilidad varía del 100 % de mortalidad a una pequeña reducción de las tasas de supervivencia. Sin embargo, en general, los insectos adultos parecen ser inmunes al efecto de silenciamiento de tTA, por lo que es posible criar insectos que comprendan un sistema tTA de retroalimentación positiva en presencia de tetraciclinas, y luego liberar los insectos adultos en el medio. Estos insectos no suponen o mínimamente, una desventaja para el tipo silvestre, y se cruzarán con los insectos de tipo silvestre, pero las larvas que portan el casete tTA de retroalimentación positiva morirán antes de alcanzar la madurez.
- Es relativamente sencillo modificar la secuencia de tTA para mejorar la compatibilidad con la especie de insecto que se desee, y esto se ha demostrado en los Ejemplos adjuntos, con tTAV, el cual tiene dos aminoácidos adicionales que proporcionan un sitio para proteasas, pero que se codifica por una secuencia que se ha cambiado sustancialmente a partir de la del tTA con el fin de que se ajuste más estrechamente a su uso en *Drosophila*.
- En consecuencia, en un aspecto preferido, la presente invención proporciona un sistema como el que se describe, en el que al menos un gen es tTA, o es un gen que codifica un producto similar al tTA eficaz para regular positivamente el promotor tetO.
- Por tanto, la presente invención es útil en combinación con un gen letal dominante, que permita la expresión selectiva del gen letal dominante, o la expresión en un estadio específico, como se desee, del gen letal o del fenotipo letal. Se apreciará que el gen letal dominante no necesita de una parte integral del mecanismo de retroalimentación positiva, sino que puede ser parte de un casete bicistrónico, por ejemplo. Particularmente se prefiere el uso de la presente invención en asociación con RIDL (Liberación de Insectos que son portadores de un Dominante Letal).
- El control del mecanismo de retroalimentación positiva, en el caso de tTA o un análogo del mismo, se efectúa simplemente por la presencia o ausencia de tetraciclina, o por modulación de la concentración de tetraciclina, cuando se utiliza el producto del gen tTA. En el caso de otro sistema de retroalimentación positiva, el GAL4, se puede controlar por ejemplo, por temperatura, suprimiendo de esta manera el gen eficaz, preferentemente un gen letal dominante, hasta que se libere el insecto.
- Se pueden emplear también otros mecanismos, tales como ribozimas o antisentido o moléculas ARN parcialmente autocomplementarias, tales como ARN en horquilla, para inhibir o evitar la expresión de un péptido activador, o agentes bloqueantes que impidan la unión del activador al sitio potenciador.
- Tales agentes bloqueantes pueden expresarse en el mismo insecto bajo condiciones selectivas, o se pueden administrar, por ejemplo, como parte del medio de cultivo.

Cuando el agente bloqueante o controlador se produce en el insecto, se prefiere entonces que su expresión sea selectiva, tal como que sea específica del sexo. La administración del agente bloqueante en el medio de cultivo, por ejemplo, hará posible la supresión del casete de retroalimentación positiva bajo cualquier circunstancia, hasta la liberación del insecto, tras la cual se producirá la selección específica sea por el sexo o el estadio, preferentemente en una generación posterior, preferentemente, de manera particular, en la siguiente generación.

Más preferentemente, el casete que comprende el mecanismo de retroalimentación positiva se asocia con la especificidad por el sexo o el estadio. Por ejemplo, se ha observado corte y empalme específico del sexo en los mecanismos de *transformación* y de *sexo doble* vistos en la mayoría de insectos, y se puede emplear para limitar la expresión del sistema de retroalimentación en un sexo en particular, empleando el corte y empalme específico de sexo por ejemplo, para eliminar todo o parte del gen efector, o para incorporar un desplazamiento de la fase de lectura o un codón de terminación, o para modular la estabilidad de ARN o la eficacia traduccional de ARNm, o cualquier otra cosa que afecte la expresión para la diferenciación entre sexos. Se prefiere particularmente dirigirlo contra las hembras de las especies dañinas.

Aunque es posible proporcionar el gen efector en un lugar diferente e incluso en un cromosoma separado, generalmente es preferible unir el gen efector con el gen de retroalimentación. Esto se puede conseguir bien situando los dos genes en tándem, incluyendo la posibilidad de proporcionar los dos como un producto de fusión, o por ejemplo proporcionando cada gen con su propio promotor en orientaciones opuestas pero en yuxtaposición con el sitio potenciador.

Un gen efector es el gen del que se desea potenciar la expresión. Cuando el producto de retroalimentación positiva también es eficazmente letal para un estadio específico, tal como el tTA en muchas especies, entonces el gen efector y el gen de retroalimentación puede ser uno y el mismo, y esto es una realización preferida.

El gen efector será a menudo un gen letal, y se prevé que el sistema de la presente invención se empleará más frecuentemente en el control de las poblaciones de insectos dañinos, particularmente en combinación con la técnica RIDL o un procedimiento relacionado, como se describe posteriormente.

Se prefiere incluir un marcador con los sistemas de la invención, tales como DsRed, proteínas fluorescentes verdes, y variantes de los mismos, ya que las tasas de éxito en insectos son extremadamente bajas, es útil ser capaces de poderlos seleccionar de alguna manera.

El promotor puede ser un gran promotor complejo, pero estos tienen a menudo la desventaja de que se utilizan muy poco o esporádicamente cuando se utilizan en huéspedes no insectos. En consecuencia, se prefiere emplear promotores mínimos, tales como Hsp70, que aunque tiene naturalmente relativamente un bajo nivel de actividad, puede potenciarse sustancialmente en un escenario de retroalimentación positiva, tal como el que usan tTA y tetO.

Un promotor es una secuencia de ADN, generalmente directamente corriente arriba de la secuencia codificante, que se necesita para la transcripción básica y/o regulada de un gen. En particular, un promotor tiene la información suficiente para permitir el inicio de la transcripción, que tiene generalmente un sitio de inicio del comienzo de la transcripción y un sitio de unión para el complejo de la polimerasa. Un promotor mínimo generalmente tendrá suficiente secuencia adicional para permitir que esos dos sean eficaces. Normalmente se suprime cualquier otra secuencia de información, tal como la que determina la especificidad tisular, por ejemplo, y el que se prefieran los promotores mínimos es, normalmente, porque como resultado de esta deficiencia, son sustancialmente inactivos en ausencia de un potenciador activo. Por tanto, un cistrón, o sistema, los dos términos son preferentemente intercambiables en general en el presente documento, de la invención generalmente estará inactivo cuando el o cada promotor es un promotor mínimo, hasta que un potenciador adecuado u otro elemento regulador se activa o deja de estar reprimido, normalmente el producto génico.

Por tanto, se apreciará que los promotores mínimos se pueden obtener directamente de fuentes conocidas de promotores, o derivados de los promotores más grandes que se producen naturalmente, o que por otra parte ya se conocen. Los promotores mínimos adecuados incluyen un promotor mínimo derivado de hsp70, un promotor mínimo P (ejemplificado posteriormente como WTP-tTA), un promotor mínimo CMV (ejemplificado posteriormente como JY2004-Tta), un promotor mínimo basado en Act5C, un fragmento del promotor BmA3, y un promotor core Adh (Bieschke, E., Wheeler, J., y Tower, J. (1998). Doxycycline-induced transgene expression during *Drosophila* development and aging. Mol Gen Genet 258, 571-579). Por ejemplo, el Act5C responde al tTA en *Aedes* transgénicos y la presente invención.

No todos los promotores mínimos funcionarán necesariamente en todas las especies de insectos, pero es fácilmente evidente para los expertos en la técnica cómo hacer para asegurar que el promotor se active. Por ejemplo, un plásmido u otro vector, que comprenda un cistrón de la invención con el promotor mínimo a ensayarse además comprende un marcador, un gen que codifica una proteína fluorescente, bajo el control de un promotor que se sepa que funciona en esas especies, el procedimiento además comprende el ensayo de la expresión del marcador en individuos transgénicos relacionados, y el ensayo de la expresión del gen bajo el control del promotor mínimo en los individuos que expresan el marcador, ensayando el ARN transcrito. La presencia del ARN por encima de los valores

antecedentes bajo condiciones inducidas o no reprimidas es indicativo de que el promotor mínimo está activo en las especies que se investigan; la ausencia o presencia de solo bajos niveles de tal ARN en condiciones no inducidas o reprimidas es indicativo de que el promotor mínimo tiene una actividad intrínseca basal baja.

- 5 Nosotros hemos utilizados los siguientes promotores marcadores, a modo de ejemplo solamente, pero muchos otros son útiles y aparentes para los expertos en la técnica:

mini-blanco (promotor blanco): WPT-tTA, JY2004-tTA

Promotor Act5C: LA513 y LA517

- 10 Promotor ubi-p63E: LA656 y LA1038

Promotor BmA3: LA710

Potenciador hr y promotor ie1: LA920, LA1124 y LA1188

y todos estos son útiles como o en la preparación de promotores mínimos.

- 15 Se apreciará que un cistrón o sistema de la invención puede comprender dos o más cistrones. Un sistema puede comprender además elementos no unidos, tal como cuando un segundo gen que va a expresarse está lejos del cistrón de retroalimentación positiva.

- 20 Por lo tanto, en un aspecto preferido, la presente invención proporciona construcciones de retroalimentación positiva de la forma general que se muestra en la Figura 1. En este escenario, la proteína activadora de la transcripción que reprime la tetraciclina (tTA), cuando se expresa, se une a la secuencia del operador tetO y da lugar a la expresión de un promotor mínimo cercano. En la configuración mostrada, este da lugar entonces a la expresión de tTA, que se une entonces al tetO, y así sucesivamente, creando un sistema de retroalimentación positiva. Este sistema se inhibe por la tetraciclina, que se une a la tTA y evita que se una a tetO.

- 25 La expresión es controlable, y puede conseguirse uniendo operativamente el promotor a un factor de transcripción controlable. Como se ilustró anteriormente, puede ser tTA (que se reprime o se induce por tetraciclina), o cualquier otro sistema de factor controlable, tal como GAL4 (que es ligeramente sensible al frío, y que puede además controlarse por el uso de GAL80 o mutantes del mismo), o por ejemplo, el sistema de expresión regulado por estreptogramina. Se apreciará que los otros sitios de unión apropiados del factor de transcripción dependerán del factor de transcripción de que se trate, tales como, por ejemplo UAS_{GAL4} (secuencia de activación corriente arriba) para GAL4.

- 35 Los sistemas preferidos de la presente invención tienen altos niveles de expresión inducida, preferentemente disponible a varios niveles de inducción, con un bajo nivel basal de expresión del gen regulado, pero también de cualquier otro componente, y preferentemente a través de un intervalo de especies. Los niveles basales preferentemente son bajos o esencialmente no existen cuando la expresión es fuertemente perjudicial, aunque los niveles aceptables dependerán del efecto del producto. Los niveles máximos generalmente no serán un problema, ya que la condición de retroalimentación positiva a menudo producirá niveles de expresión mortales e, incluso

- 40 cuando la expresión del producto no es mortal, o asociado con consecuencias fatales, es posible que se expresen en mayores concentraciones que la mayoría de los productos génicos.
- 45 Cuando se desea un nivel basal de expresión, se puede emplear una secuencia que no necesite la presencia de un potenciador, aunque generalmente habrá retroalimentación. Como al menos hay un nivel de corte de la retroalimentación, por debajo del cual la retroalimentación no funciona, se apreciará entonces que se prefiere mantener un mínimo de expresión retroalimentada del gen.

- 50 Las diferentes construcciones de la presente invención (descritas en los Ejemplos adjuntos) tienen varias actividades, según los componentes de las construcciones. Por ejemplo, en *Drosophila*: WPT-tTA da lugar a un nivel bajo de expresión inducida (no reprimida). JY2004-tTA da lugar a una fuerte expresión cuando no se reprime, aproximadamente equivalente al Act5C-tTA LA513 es letal cuando no se reprime.

- 55 Los primeros dos parecen que dan una expresión constitutiva, a juzgar por el uso de un gen indicador (tRE-EGFP), esto es difícil de evaluar para el LA513 letal, aunque a 10 µg/ml tet, es justo suficiente para una buena supervivencia, el LA513 en *Drosophila* conduce a la expresión de un gen indicador tetO₇-EGFP tanto en la línea germinal masculina y femenina en adultos, así como en células somáticas. Esto lo distingue de Act5C, que se utiliza comúnmente como un promotor "ubicuo, constitutivo", que, de hecho, no se expresa bien en estas células.

- 60 Las propiedades de estas construcciones se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1

	Expresión Máx.	Promotor mínimo	Intrón	¿Región codificante optimizada?	3'UTR y poliA
WPT-tTA	Baja	P	PP1α96A	No	<i>fs(1)K10</i>
JY2004-tTA	Alta	CMV	β-globina Conejo	No	β-globina Conejo
LA513	Muy alta (letal)	Hsp70	Adh	Sí	<i>fs(1)K10</i>

En consecuencia, se apreciará que el nivel de expresión inducida o no reprimida se puede modificar de manera útil y predecible ajustando la secuencia del sistema de retroalimentación positivo. La toxicidad y/o la actividad de la proteína tTA se puede modificar independientemente de las señales de control de la transcripción o traducción por medio de varias estrategias, por ejemplo, utilizando una señal de localización nuclear, una modificación del dominio de activación, etc. (véase Fussenegger, 2001 para más ejemplos).

La letalidad de LA513 es útil, por las razones dadas anteriormente, y más particularmente porque:

- Proporciona un sistema génico letal que se puede reprimir compacto y altamente eficaz;
- Como utiliza solamente elementos de control simples de *Drosophila* (promotor mínimo hsp70, un intrón pequeño y un terminador de fs (1) K10), tanto este, como su casete de expresión, funcionan a lo largo de un amplio intervalo filogenético;
- Tiene un efecto perjudicial muy pequeño, si tiene alguno en adultos, incluso en ausencia de tetraciclina. Esta es una propiedad muy deseable y sorprendente en el campo de su uso, por ejemplo en un programa de control basado en RIDL, en el que los adultos liberados deben ser competitivos y tienen que tener una vida larga para la eficacia completa del programa. Se apreciará que el efecto del sistema de la invención podría ser modificado además incorporando un letal eficaz para adultos, por ejemplo en la configuración "expresión bidireccional - retroalimentación positiva" descrita en el presente documento; y
- Por su naturaleza, se minimiza la "comunicación" entre varios elementos. Esto es porque: (i) el core de la construcción solamente es un elemento compositivo, mejor que los dos sistemas de expresión bipartita: (ii) el potenciador principal del componente autorregulador, los sitios de unión tTA, está activo esencialmente solo en ausencia de tetraciclina y (iii) la expresión modesta de tTA bajo la influencia de un potenciador próximo, sea en otra parte de la construcción o en el cromatina cercana, es poco probable que sea perjudicial de manera significativa.

JY2004-tTA también es útil en la presente invención.

Sin quedar ligados por ninguna teoría, el mecanismo por el cual el LA513 mata los embriones y las larvas recientes, pero no los adultos parece ser que es una propiedad inherente de su toxicidad. La toxicidad de tTA se cree que deriva de su "silenciamiento de la transcripción", en el que el alto nivel de expresión del dominio activador de la transcripción (en el caso de tTA es el VP16 o un fragmento del mismo) se une a elementos de la maquinaria de la transcripción y los valora, conduciendo a un efecto general sobre la transcripción, aunque también puede actuar saturando la ruta de degradación de la ubiquitina. El silenciamiento de la transcripción es el efecto que se cree que produce los efectos perjudiciales en las líneas celulares de mamíferos que expresan altos niveles de tTA; en el contexto de la expresión optimizada de retroalimentación positiva de LA513 conduce a la expresión de tTA a niveles letales. Sin embargo, los estados en desarrollo pueden ser más sensibles a la ruptura de la transcripción que los adultos: puesto que tienen que expresar los genes de una manera altamente coordinada para alcanzar un desarrollo apropiado, mientras que los adultos pueden ser más tolerantes a la ruptura.

El desarrollo de los heterocigotos LA513 en el medio con un nivel intermedio de tet (3 o 10 µg/ml), siendo suficiente para sobrevivir, mostró un retraso significativo, en relación a sus hermanos del tipo silvestre. Experimentos paralelos utilizando altas concentraciones de tetraciclina, por ejemplo 100 µg/ml, no mostraron ningún retraso del desarrollo, sugiriendo de esta manera que la expresión subletal de tTA puede afectar adversamente el desarrollo normal de los insectos.

Se prefiere que el sistema de retroalimentación positivo muestre una alta relación entre conexión: desconexión y que el cambio de conectado a desconectado sea sobre un intervalo de concentración más estrecho que en un sistema convencional, permitiendo de esta manera la utilización de una amplia variedad de moléculas efectoras. Se pueden utilizar moléculas efectoras con toxicidad baja (baja actividad específica), que se puedan expresar a altos niveles bajo las condiciones activas sin llevar a problemas de toxicidad a niveles basales. A la inversa, las más tóxicas (con actividad específica alta) se pueden utilizar a niveles basales necesariamente bajos que no impidan altos niveles de expresión cuando se dejan de reprimir o se inducen. Como el nivel basal de expresión se determina solo parcialmente por el nivel de tTA, en el caso de las moléculas de toxicidad baja supone una ventaja particularmente clara. La tTA es un ejemplo preferido de una molécula efectora con una baja actividad específica que se puede utilizar como letal en el contexto de retroalimentación positiva de LA513, por ejemplo. La ventaja del cambio de

conectado a desconectado en un intervalo de concentración estrecho es que se puede utilizar una concentración modesta de represor sin riesgo de expresión residual (no totalmente reprimida) que conduzca a efectos adversos que potencialmente seleccionen por la resistencia. Por el contrario, para un sistema inducible, las concentraciones modestas del activador pueden dar una expresión completa.

Los controladores activados o no reprimidos son útiles para expresar moléculas efectoras. Ejemplos de moléculas efectoras incluyen ARN funcionales, ribozimas, etc., y una o más proteínas codificadas. Se apreciará que, son apropiados diferentes niveles de expresión, para diferentes aplicaciones. Como los factores de transcripción específicos de secuencia utilizados para controlar el sistema de retroalimentación positiva también se pueden utilizar para expresar otros genes en un sistema de expresión bipartita, se puede conseguir haciendo dos construcciones separadas, una con el controlador (normalmente una construcción de un factor promotor de la transcripción, siendo aquí una construcción de retroalimentación positiva), el otro con el gen o la molécula de interés bajo el control de un promotor compuesto (sitio de unión + promotor mínimo) que responde al factor de transcripción (Bello y col., 1998; Brand y col., 1994). Esto también es apropiado para estos controladores de la retroalimentación positivos. De manera alternativa, los dos elementos se pueden combinar en la misma construcción. Esta realización tiene ventajas significativas para la mayoría de las aplicaciones de campo, como que se reduce sustancialmente el riesgo de que los dos componentes se separen por recombinación. Además, el sistema completo de expresión se puede introducir en un solo acontecimiento de transformación, lo que significa que los insectos homocigotos para el sistema son homocigotos para un locus solamente mejor que dos, lo que hace más fácil construirlos por reproducción, y tiende a reducir pérdida en la aptitud biológica debido a mutagénesis por inserción.

También es posible condensar tal sistema de expresión en una forma más compacta, tal como se ilustra en la Figura 2 adjunta.

Esto aprovecha la naturaleza bidireccional de los potenciadores, en este caso el sitio de unión tetO en presencia de tTA. Esta disposición además permite, o facilita, el uso de elementos aisladores para reducir el efecto de potenciadores o supresores de la cromatina adyacente: en esta disposición el casete de expresión completo puede estar flanqueado por aisladores. Esta disposición también elimina la necesidad de duplicar los sitios de unión del factor de transcripción en la construcción. Tal duplicación es preferible evitarla, porque puede llevar a inestabilidad durante la recombinación homóloga. Por razones similares, generalmente se prefiere utilizar aisladores no idénticos, tales como scs y scs', mejor que utilizar el mismo dos veces.

Es posible además condensar el sistema para proporcionar una transcripción única, sea bicistrónica o expresando un único polipéptido, el cual puede potencialmente procesarse además en más de una proteína, por ejemplo por el uso de una técnica de fusión a ubiquitina (Varshavsky, 2000). Cada una de estas estrategias (expresión bidireccional, expresión bicistrónica, proteína de fusión con transactivador) tiende a reducir el tamaño de la construcción, lo que a su vez tiende a aumentar la frecuencia de transformación y reduce el que se convierta en una diana mutagénica. Tal condensación se puede conseguir por varias formas, como se muestra, en forma de diagrama, en la Figura 3 adjunta. Las extensiones apropiadas y las variaciones de las disposiciones mostradas en forma de diagrama serán evidentes para los expertos en la técnica.

Como un ejemplo de la utilidad de tal sistema, se puede construir un marcador general de transformación utilizando un sistema transactivador que se sepa que funciona sobre un amplio intervalo filogenético, por ejemplo, el que se basa en tetR, GAL4, lexA o AcNPV ie-1. Tal transactivador, unido funcionalmente a una región codificante por una proteína fluorescente por cualquiera de los procedimientos anteriores (expresión bidireccional, expresión bicistrónica, proteína de fusión con transactivador), proporcionaría un marcador genético expresado por un amplio intervalo de tejidos y estadios de desarrollo a lo largo de un intervalo filogenético amplio. Tal marcador debería ser útil no solo para detectar los transgénicos en transformación y otros experimentos de laboratorio, sino también para distinguir, por ejemplo, las moscas transgénicas de las moscas de tipo silvestre en el campo, o aquellas capturadas en el campo.

Otro ejemplo es la expresión de una transposasa, integrada en los cromosomas, que sería una construcción "impulsadora", por ejemplo la transposasa *piggyBac* integrada en un cromosoma de insecto utilizando *mariner/mos1*. Tales construcciones son útiles para removilizar elementos *piggyBac*. Un impulso aplicable ampliamente debería expresarse a un nivel significativo a lo largo de un amplio intervalo filogenético. El sistema de expresión de la presente invención proporciona esto. Además, tal construcción (*piggyBac* transposasa bajo el control de un sistema de retroalimentación positivo de una de las estructuras mencionadas) debería ser útil también en la transformación de insectos por medio de expresión transitoria (co-expresión de un plásmido "auxiliar", el procedimiento utilizado más ampliamente para transformación de insectos), y así mismo sería útil y funcional a lo largo de un amplio intervalo filogenético.

Es ventajoso regular la acción de un sistema de expresión en el estadio, sexo u otros niveles, además de ser capaz de regular el nivel de expresión cambiando las condiciones ambientales. Ejemplos adecuados son los siguientes:

1. Expresión de una proteína represora.

Las proteínas represoras se conocen o pueden construirse para los principales sistemas de expresión, por ejemplo GAL80 o sus derivados mutantes por el sistema GAL4, el tetR fusionado a proteínas inhibidoras por el sistema tet, etc. Otra alternativa es el silenciamiento génico del factor de transcripción utilizando un ARN en horquilla dirigido contra parte del casete de expresión. La expresión basal a partir del sistema de retroalimentación positiva es bastante bajo, de forma que se puede suprimir fácilmente por la expresión de tal inhibidor.

La expresión de un inhibidor adecuado bajo un control adecuado tenderá a inhibir la expresión a partir del casete de expresión de retroalimentación positiva donde se expresa el inhibidor. La expresión específica femenina, por ejemplo, puede alcanzarse de esta manera expresando un inhibidor en machos.

2. Integración de especificidad en el sistema de retroalimentación positiva.

La especificidad se puede integrar en el sistema de retroalimentación positiva utilizando componentes que son específicos por sí mismos. Por ejemplo, la señal de la combinación del promotor mínimo hsp70 + intrón SV40 y poliA de pUAST se sabe que no se expresa en la línea germinal femenina de *Drosophila*, mientras que la señal del promotor mínimo P + intrón P + fs (1) K10 poliA de pUASp se expresa (Rorth, 1998). Los sistemas de retroalimentación positiva pueden, de este modo, construirse para que específicamente se expresen o no en este tejido, dependiendo del uso de los elementos reguladores apropiados.

En otra realización, se puede integrar una especificidad de sexo en el sistema por el uso de un corte y empalme específico de sexo. El corte y empalme específico de sexo de *doble sexo* y sus homólogos es un mecanismo regulador conservativo y, por tanto, disponible para su uso de esta forma en un amplio intervalo filogenético. El corte y empalme específico de sexo de *transformación* y sus homólogos es otra alternativa. El uso de corte y empalme específico de sexo en un sistema de expresión de retroalimentación positivo se puede conseguir de varias formas, como se muestra, en forma de diagrama en la Figura 4 adjunta. Las extensiones apropiadas y las variaciones de las disposiciones mostradas en forma de diagrama serán evidentes para los expertos en la técnica.

En otra configuración, un sitio de corte y empalme específico se puede insertar en una región que codifica el transactivador de forma que dos o más proteínas alternativas se producen en distintas condiciones, por ejemplo, en diferentes tipos celulares o en sexos diferentes. Esto se puede ordenar de forma que se produzca un activador de transcripción en un tipo celular pero en otro tipo celular lo que se produce es un represor de transcripción. Esta disposición tiene la ventaja de que es relativamente robusta frente a la producción debido a un corte y empalme ineficaz (imperfecto) de una proporción relativamente baja de activador de la transcripción en el tipo celular apropiado, por ejemplo, en células masculinas, será menos probable que produzca una amplificación de retroalimentación positiva ya que estas células están produciendo también una gran cantidad de represor. La discriminación en el resultado (relación entre los niveles de activador de transcripción en los dos tipos celulares, o la relación de la expresión de un indicador u otro ARN o proteína ligado funcionalmente a la expresión del activador de la transcripción) entre los dos tipos celulares se mejora de esta manera.

Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que cualquiera de estas disposiciones del transactivador específico puede combinarse fácilmente con cualquiera de las disposiciones desveladas en el presente documento para la expresión de una proteína adicional o ARN, por ejemplo, expresión bidireccional, expresión bi o multicistónica, expresión de una proteína de fusión, o combinado con uno o más casetes de expresión separados dependiendo de, o parcialmente dependiendo de, la expresión del transactivador, sea combinado en la misma construcción o en cualquier sitio del genoma o la célula.

3. Utilización de una molécula efectora específica

La especificidad en la consecuencia fenotípica también se puede introducir por el uso de una molécula efectora específica. Cuando una molécula, por ejemplo ARN o una proteína, que se expresa bajo el control de cualquiera de los sistemas de expresión descritos en el presente documento tiene un efecto específico solo en células particulares, tejidos, o sexo, etc., entonces, se puede obtener la especificidad fenotípica con una expresión específica más o menos amplia del transactivador. Por ejemplo, en el contexto de un programa de control de la población con liberación masiva de insectos tipo RIDL, utilizando el sistema de expresión de una molécula solamente tóxica o preferentemente tóxica, para los estadios previos a adultos, da como resultado adultos que son completamente, o razonablemente competitivos en relación al tipo silvestre. Esto es deseable, ya que la efectividad del programa depende de la competitividad y la longevidad de las formas adultas, cuando se liberan en el medio. Como la concentración de su represor interno (por ejemplo, la tetraciclina) es probable que disminuya en el medio libre, sería ventajoso asegurar que la inducción (sin represión) del sistema de expresión, como y cuando ocurre en adultos, tenga un efecto negativo mínimo sobre ellos.

Como otro ejemplo, la separación de sexos, o los efectos específicos del sexo, se pueden conseguir por la expresión en machos y hembras de una molécula con efectos diferentes en machos y en hembras. Por ejemplo, la expresión de la proteína Transformadora en machos de *Drosophila* tenderá a transformarles en hembras, pero no tendrá efecto

en hembras. Similarmente, la expresión de la proteína específica de machos letal-2 (*Msl-2*) en *Drosophila* tenderá a matar hembras, pero no machos (Gebauer y col., 1998; Kelley y col., 1995; Matsuo y col., 1997; Thomas y col., 2000). A la inversa, la expresión de una molécula de ARN parcialmente autocomplementaria con homología sustancial en su región autocomplementaria, o región formadora de doble cadena ("contra ARN en horquilla") para la transformación tenderá a transformar las hembras genéticas en machos fenotípicos, mientras que los machos genéticos no se afectan, y la expresión de ARN en horquilla contra *msl-2* tenderá a ser letal para los machos pero no para las hembras. La expresión de ARN en horquilla contra los exones específicos de machos o hembras de doble sexo tenderán a afectar esos sexos solamente, y la expresión simultánea de ARN que codifique la otra forma de doble sexo (es decir, Dsx^M en hembras o Dsx^F en machos) tenderá a modificar o potenciar este efecto. Esta expresión simultánea de una proteína y una molécula de ARN en horquilla se puede conseguir fácilmente combinando la estrategia bicistónica o de proteína de fusión descrita anteriormente con la expresión de un ARN en horquilla utilizando un sistema de expresión bidireccional como se ha descrito anteriormente. Se puede añadir además especificidad de sexo, estadio u otra a tal sistema por la incorporación del corte y empalme específico apropiado u otras señales de control de la transcripción, traducción u otras post-traduccionales en cualquier parte del sistema como será evidente para la persona experta en la técnica.

Las moléculas de ARN en horquilla multifuncionales se pueden construir y están previstas. Por ejemplo, el ARNi contra la transformación de la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* Wiedmann (mosca mediterránea de la fruta) tenderá a transformar las hembras genéticas en machos fértiles. Para un programa de control de la población en un área amplia que se base en la liberación masiva de tales insectos, es preferible esterilizar las moscas liberadas. Esto se puede conseguir utilizando una molécula de ARN compuesta que rompa simultáneamente la expresión de ambas transformaciones y un gen necesario para la espermatogénesis o la viabilidad embrionaria o larvaria. Muchos de tales genes se conocen en *Drosophila* con homólogos en mosquitos u otros animales. Con la mosca mediterránea de la fruta, se puede fácilmente aislar un homólogo adecuado, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Nosotros preferimos utilizar un gen que permita la producción de fluido seminal, y preferentemente también esperma, para reducir la tendencia de la hembra a aparearse de nuevo después de la inseminación por el macho afectado. Particularmente preferimos dirigir esta segunda parte de la molécula de ARNi en horquilla contra el efecto letal paterno, de forma que no se produzca una descendencia viable, o contra el gen expresado cigóticamente que se necesita para la viabilidad embrionaria o larvaria o el desarrollo, de forma que la descendencia heredera de la construcción estará afectada. Se han concebido otras construcciones y serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica: por ejemplo la expresión de una proteína letal específica de hembras por la expresión bicistónica y un ARN en horquilla que da lugar a un efecto letal paterno por expresión bidireccional. En común con el ARN en horquilla compuesto contra un gen adecuado de determinación del sexo y un efecto letal paterno, se permite la generación de una población de insectos de un solo sexo (solo machos), cuya descendencia entera morirá por la acción de la acción del efecto letal paterno, independientemente de si su progenie o parejas se alimentan con tetraciclina. Por tanto, la presente invención proporciona un promotor controlado, como se ha definido, en el que el promotor está unido operativamente con el ADN que codifica un ARNi que produce mortalidad o esterilidad. En este caso, la mortalidad puede corresponder a baja salud, tal como falta de vuelo, más que a una letalidad instantánea, produciendo que la probabilidad de emparejamiento se reduzca sustancialmente.

4. Utilización de recombinasa(s) específica(s) del sitio

La especificidad se puede introducir también en un sistema de retroalimentación positiva insertando un fragmento "tapón" que lo inactive. Si este fragmento "tapón" está flanqueado por los sitios diana para una recombinasa específica del sitio adecuada, entonces tenderá a escindirse en presencia de la recombinasa activa. Cualquier sistema para la expresión selectiva de una recombinasa activa, por ejemplo, la expresión de la recombinasa bajo el control de un promotor específico de hembras, tenderá por tanto a producir la expresión selectiva del sistema de retroalimentación positiva, en este caso solamente en hembras. Si la recombinasa solamente se expresa en células somáticas, por ejemplo utilizando el procedimiento descrito anteriormente, entonces la versión transmitida a la siguiente generación incluye el fragmento tapón, el cual puede estar de nuevo en las hijas pero no en los hijos. A la inversa, si la recombinasa se expresa solamente en el genoma, la provisión de recombinasa activa conducirá a una prole en la que el sistema de expresión está activo, a partir de los padres en los que está inactivo. Esto se puede utilizar, por ejemplo para generar gametos que contienen un sistema génico letal dominante o estéril (por ejemplo, específico de hembras o no específico del sexo) para su uso en una estrategia de control de población de insectos.

En una realización preferida, el fragmento tapón codifica la recombinasa. Esta realización es particularmente compacta. En otra realización preferida, el fragmento tapón codifica un represor de la transcripción que tiende a inactivar el sistema de expresión de retroalimentación positiva- esta realización tiende a reducir la expresión basal del sistema en presencia del fragmento tapón.

A la inversa, el sistema se puede inactivar específicamente en ciertas células o clones de células, introduciendo sitios diana para una recombinasa específica del sitio adecuada en posiciones adecuadas, y luego expresando o introduciendo la recombinasa activa adecuada en las células apropiadas, tal que uno o más elementos funcionales clave del sistema de expresión se eliminan o rompen por recombinación entre los sitios diana de la recombinasa.

Los sistemas de recombinasa adecuados incluyen *cre/lox* y *Flp/FRT*.

La presente invención se ilustra por los siguientes Ejemplos, no limitantes. En los siguientes ejemplos, las Figuras son las siguientes:

- La Figura 1 muestra un escenario de activador de la transcripción que se reprime por tetraciclina;
- La Figura 2 muestra un sistema de la invención que utiliza un potenciador bidireccional;
- La Figura 3 muestra un sistema específico de sexo;
- La Figura 4 muestra otro sistema específico de sexo;
- La Figura 5 es un diagrama de la región tetO₇-tTA del pJY2004;
- La Figura 6 es un diagrama esquemático de pLA513;
- La Figura 7 es un diagrama esquemático del transposón del LA513;
- La Figura 8 es un diagrama esquemático del pLA517;
- La Figura 9 ilustra la acción bidireccional de tetO₇ en mosquitos 513A y 513B;
- La Figura 10 es un diagrama esquemático de pLA656;
- La Figura 11 es un diagrama esquemático de pLA928;
- La Figura 12 es un diagrama esquemático de pLA1124;
- La Figura 13 es un diagrama esquemático de pLA670;
- La Figura 14 es un diagrama esquemático de pLA1038;
- La Figura 15 es un diagrama esquemático de pLA710;
- La Figura 16 ilustra el corte empalme específico de sexo de Ccra en la mosca mediterránea de la fruta;
- La Figura 17 es un diagrama esquemático de pLA1188; y
- La Figura 18 ilustra el corte empalme específico de sexo en la mosca mediterránea de la fruta.

Ejemplos

- Se hicieron una serie de construcciones con tTA en una configuración de retroalimentación positiva, es decir con la expresión de tTA regulada por la unión de tTA a tetO. Se obtuvieron los insectos transgénicos que portaban estas construcciones y se analizaron sus propiedades.

tTAV

- En algunos casos, la intención era obtener niveles muy altos de expresión de tTA en ausencia de tetraciclina. En varias construcciones ejemplificadas descritas posteriormente en el presente documento, la expresión de tTA era tan alta como para ser letal. Como parte del proceso de obtención una fuerte expresión de tTA, parte de la fase de lectura abierta de tTA se rediseñó para expresar una proteína similar, pero con el uso de un codón cercano a la norma para *Drosophila melanogaster*, y deficiente en algunos sitios crípticos potenciales de corte y empalme presentes en la secuencia de nucleótidos original. Esta variante de la secuencia de tTA se llamó tTAV (SEC ID N° 3, secuencia proteica SEC ID N° 32).

EJEMPLO 1

WTP-tTA y JY2004-tTA en *Drosophila melanogaster*

- La región codificante de tTA (SEC. ID N° 29, secuencia proteica SEC ID N° 30) de pUHD15-1 (SEC ID N° 33, Gossen y col., 1994, Gossen y Bujard, 1992) se situó bajo el control de tetO, en una configuración de retroalimentación positiva, insertándola en pWPT2 (Bello y col., 1998) o pJY2004, una versión de pJY2000 que carece de aisladores (Stebbins y Yin, 2001). Estas construcciones se llamaron pWTP-tTA y pJY2004-tTA, respectivamente. Se proporciona un diagrama de la región tetO₇-tTA de pJY2004 en la Figura 5 adjunta, y es la SEC ID N° 14.

- En pWTP-tTA los sitios de unión del tetO₇ están seguidos por un promotor mínimo del elemento P, una secuencia directora de *Drosophila hsp70*, un intrón corto del gen PP1α96A de *Drosophila*, la región codificante de tTA y un terminador de *Drosophila hsp70*. En pJY2004-tTA, el promotor mínimo y las secuencias directoras son de CMV, seguido por la región codificante de tTA y un terminador de la transcripción de la β-globina de conejo, como se muestra en la Figura 5.

- Las *Drosophilas melanogaster* transgénicas que portaban cualquiera de estas construcciones eran totalmente viables, incluso sin tetraciclina en la dieta. Se examinaron los insectos doblemente heterocigotos por WTP-EGFP y cualquiera de estas construcciones viendo su fluorescencia verde característica de la expresión de EGFP. Los insectos con WTP-tTA y WTP-EGFP mostraron una fluorescencia muy débil solamente ligeramente por encima de la autofluorescencia anterior. Por el contrario, los insectos con JY2004-tTA y WTP-EGFP mostraron una fuerte fluorescencia, similar a la vista en los insectos que portaban EGFP bajo control del promotor Actin5C, el cual se utiliza ampliamente como un promotor fuerte, constitutivo en *Drosophila* (por ejemplo, Reichhart y Ferrandon, 1998). La expresión de EGFP se reprimió hasta niveles indetectables cuando los insectos se criaron con una dieta suplementada con 100 µg/ml de tetraciclina. En el control de los insectos heterocigotos tanto WTP-EGFP, JY2004-tTA o WTP-tTA no mostraron fluorescencia por encima del antecedente tanto si se criaron con una dieta que contuviera tetraciclina, como si no.

Nosotros situamos la tTA bajo el control del promotor Actin5C, en el plásmido pP [Casper-Act5C-tTA]. Las moscas transgénicas que portaban esta construcción y WTP-EGFP, criadas con una dieta que carecía de tetraciclina, mostraron fluorescencia verde de intensidad comparable a la observada en moscas equivalentes con JY2004-tTA y WTP-EGFP.

Estos resultados muestran que las construcciones de retroalimentación positiva pueden utilizarse para dar una expresión reprimida por la tetraciclina fuerte (JY2004-tTA) o débil (WTP-tTA), a partir de una construcción adecuada (aquí WTP-EGFP).

El EGFP se utiliza ampliamente como un indicador neutro. Nosotros además ensayamos el cruzamiento de las moscas JY2004-tTA con moscas con construcciones capaces de expresar proteínas conocidas o predichas de ser perjudiciales. Insertamos el dominio central de Nipp1Dm (Bennett y col., 2003; Parker y col., 2002) ("nipper"), en el pJY2004, para crear el pJY2004-nipper, y se transformaron *Drosophila* con esta construcción. También utilizamos moscas que portaban tetO-hid (Heinrich y Scott, 2000). En cada caso, el cruzamiento con moscas JY2004-tTA producía mortalidad reprimida por la tetraciclina. Los datos de los dos cruzamientos del ejemplo se presentan en la Tabla 2, siguiente.

Tabla 2

Uso de construcciones de retroalimentación positiva para dirigir la expresión de genes letales en <i>Drosophila</i>				
Macho JY2004-tTA/CyO x Hembra tetO-hid/tetO-hid				[tetraciclina] (µg/ml)
JY2004-tTA	CyO			
0	15			0
9	10			100
Macho JY2004-tTA/CyO x Hembra JY2004-nipper/JY2004-nipper				
JY2004-tTA	CyO			
0	20			0
16	13			100

EJEMPLO 2

20

LA513 en *Drosophila melanogaster*

Preparamos una construcción pLA513 (SEC ID N° 16, diagrama esquemático mostrado en la Figura 6), que contenía un transposón *piggyBac* no autónomo. Generamos *Drosophila melanogaster* transgénica que portaba esta construcción por coinyección de un plásmido auxiliar en una cepa con ojos blancos (Handler, 2002; Handler y James, 2000). Los transgénicos potenciales se seleccionaron por la fluorescencia característica de DsRed2. Se recuperaron 5 líneas transgénicas, que se designaron como O53, M8, M13, F23 y F24. Un diagrama esquemático del transposón LA513 se muestra en la Figura 7 adjunta.

Las estirpes de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron a 25 °C en un medio con levadura/ azúcar/ maíz/ tetraciclina (tetraciclina (Sigma) a una concentración final de 100 µg/ml), a menos que se establezca otra cosa. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C.

Supervivencia de LA513/+ transgénicos con y sin tetraciclina

35

Se cruzaron los heterocigotos transgénicos con el tipo silvestre al menos por triplicado en el medio con y sin Tc (tetraciclina). En ausencia de letalidad alguna, se debería esperar que aproximadamente la mitad de la descendencia de tal cruzamiento sería transgénica. La descendencia se valoró como adultos jóvenes por el marcador de fluorescencia DsRed [Matz y col., 1999] utilizando un microscopio Olympus SZX12 con capacidad de fluorescencia, y se calculó la relación de fluorescentes (transgénicos) con respecto al total de moscas. Los resultados se muestran en la Tabla 3, a continuación. En estos experimentos, todas las 5 líneas transgénicas mostraron un 100 % de mortalidad, en ausencia de tetraciclina y una buena supervivencia (es decir una relación fluorescentes: no fluorescentes de ~1:1), en presencia de 100 µg/ml de tetraciclina. La inspección de los viales mostraba poca o no mucha fluorescencia en ausencia de Tc, aunque estaban presentes muchas larvas con una fluorescencia muy pequeña, al tiempo que eran visibles larvas no fluorescentes (tipo silvestre para LA513) de todos los tamaños. Esto sugiere que, en ausencia de tetraciclina, el LA513 produce mortalidad a un estadio temprano (embrionario y/o larvario reciente) del estadio de desarrollo.

Tabla 3

Las inserciones LA53 son letales dominantes que se reprimen por la tetraciclina					
Línea LA513	0 µg/ml Tetraciclina		100 µg/ml Tetraciclina		
	Nº de moscas	Nº de fluorescentes	Nº de moscas	Nº de fluorescentes	Relación
0513	490	0	1963	937	0,48
M8	74	0	66	25	0,38
M13	657	0	1838	892	0,49
F23	473	0	1914	845	0,44
F24	61	0	114	60	0,53
Total	1755	0	5895	2759	0,47

La letalidad dominante podría tener varias causas. Sin estar restringidos por teoría alguna, parece probable que, en ausencia de tetraciclina, se acumula tTAV a una concentración relativamente alta y que es letal, posiblemente debido al silenciamiento de la transcripción, o la interferencia con la degradación proteica. Una alternativa es que, en ausencia de tetraciclina, la tTAV se une a tetO y actúa como un potenciador a largo plazo, perturbando la expresión de genes cercanos a la inserción del LA513. Esto parece improbable, porque todas las 5 líneas dieron resultados similares. Cada una de estas líneas derivaba de un superviviente diferente G0 a la inyección, y por tanto estas líneas están probablemente portando el LA513 integrado en diferentes sitios genómicos. Verificamos esto por PCR inversa. La tabla 4, a continuación, muestra los sitios de integración para 3 de las líneas; en cada caso la inserción LA513 estaba en la secuencia TTAA, como se esperaba por la preferencia de inserción en el sitio del transposón *piggyBac*. Como se esperaba, las tres inserciones estaban además en 3 sitios diferentes en el genoma de la *Drosophila*.

Tabla 4

Sitios de inserción de LA513 en el genoma de <i>Drosophila</i>				
Línea	Secuencia amplificada o al sitio de integración	Brazo del cromosoma predicho	Citología de <i>Drosophila</i> predicha	Gen más próximo predicho
O513	Cacagcgcgatgatgagcaca TTAA caaaatgtagtaaaatagga (SEC ID Nº 1)	2L	25F4-25F5	CG9171
M8	Gtttcgataaaatattgctat TTAA aatgctattttcaatgcta (SEC ID Nº 2)	2L	36F6-36F6	CG15160
F24	Tttgttttctaacgttaaag TTAA agagagtccagccacatttt (SEC ID Nº 3)	2L	21C4-21C5	CG13691

Se muestra la secuencia que está flanqueando el sitio de inserción, TTAA, en mayúsculas. Las localizaciones cromosómicas predichas, y el gen más próximo predicho, se muestran también; estos están basados en la secuencia de *Drosophila* publicada.

EJEMPLO 3

Reducción de la toxicidad de tTAV

El efecto tóxico del nivel de expresión alto de tTAV se cree que es debido al silenciamiento de la transcripción y/o a la interferencia con la proteólisis dependiente de ubiquitina, por medio de la sección derivada de VP-16 (Gossen y Bujard, 1992; Salghetti y col., 2001). Por lo tanto, nosotros hemos modificado el tTAV eliminando la sección VP16 y sustituyéndola con una secuencia sintética que codifica 3 copias de un péptido (PADALDDFDLML) derivado del VP16 (Baron y Bujard, 2000; Baron y col., 1997). Este derivado se llamó tTAF; el plásmido resultante se llamó pLA517, y es la SEC ID Nº 17, y se muestra, en forma de diagrama, en la Figura 8 adjunta.

Se transformó la *Drosophila melanogaster* con esta construcción, y se obtuvo una línea transgénica. Los machos LA513 heterocigotos se cruzaron con hembras del tipo silvestre (para LA513) y se valoró la fluorescencia de la descendencia (como adultos). Si toda la descendencia tenía la misma probabilidad de sobrevivir, la proporción esperada de la descendencia total fluorescente era del 50 %. En ausencia de tetraciclina, esta proporción fue del 32 %, solamente una reducción modesta comparada con el 48 % cuando los parentales y la descendencia se mantuvieron con una dieta se suplementó con 100 µg/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 5, a continuación. Ensayamos si la suplementación de tetraciclina en la dieta de los parentales pero no de la descendencia podría reducir esta mortalidad. En este caso, observamos una proporción intermedia de 0,37, indicando que la tetraciclina

contribuida maternalmente tenía un efecto beneficioso modesto.

Tabla 5

Efecto de la tetraciclina en la supervivencia de LA517/+ <i>Drosophila</i> y sus hermanos +/-			
LA517			
Parental [Tc] µg/ml	Descendencia [Tc] µg/ml	No fluorescentes	Fluorescentes
0	0	165	78
100	100	524	482
100	0	502	297

Como el LA517, solo, tiene poco impacto sobre la viabilidad, a diferencia de la construcción LA513 estrechamente relacionada, ensayamos si era capaz de controlar la expresión de un gen heterólogo bajo el control de tetO. Para esto utilizamos tetO-hid (Heinrich y Scott, 2000). Las moscas homocigotas por tetO-hid se cruzaron con las moscas heterocigotas por LA517. En ausencia de tetraciclina solamente el 3,4 % de los descendientes adultos llevaban el LA517. En presencia de 100 µg/ml de tetraciclina, la proporción era del 42 %. Por lo tanto el LA517 es capaz de dirigir la expresión eficaz de un gen heterólogo.

Tabla 6

Efecto de la tetraciclina en la supervivencia de LA517/+, +/-tetO-hid de <i>Drosophila</i> y sus hermanos +/-, +/-tetO-hid		
TetO-Hid x LA517/+		
[Tc]	No fluorescentes	Fluorescentes
0	636	23
100	174	127

EJEMPLO 4

Utilización de análogos de la tetraciclina

Se utilizó la línea F23 para determinar si análogos químicos de la tetraciclina podían utilizarse en lugar de la tetraciclina para suprimir la letalidad de LA513. Con este fin, ensayamos 3 análogos en un intervalo de concentraciones de 0 a 100 µg/ml (suministradores: tetraciclina y doxiciclina, Sigma; 4-epi-oxitetraciclina, Acros Organics; clortetraciclina Fuzhou Antibiotic Group Corp.). Calculamos las concentraciones necesarias para la supervivencia media máxima. Se muestran en la tabla 7, a continuación.

Tabla 7

Eficacia de los análogos de Tc		
Línea	Tc/Análogo	Concentración para la supervivencia media máxima, µg/ml
F23	Tetraciclina	5,0
F23	Doxiciclina	3,9
F23	7-Clortetraciclina	1,7
F23	4-epi-oxitetraciclina	42,0

EJEMPLO 5

Longevidad de adultos LA513/+ en ausencia de tetraciclina

LA513 claramente confiere letalidad dominante, activa en el estadio embrionario o de larva reciente. Las larvas se criaron con una dieta suplementada con 100 µg/ml de tetraciclina. Después de la eclosión, los adultos se transfirieron a una dieta que carecía de tetraciclina. Se midió la duración de la vida de estos adultos, y también la de los adultos w¹¹¹⁸ no transgénicos comparables. Como se muestra en la Tabla 8, a continuación, las líneas transgénicas mostraron una supervivencia buena como adultos con respecto al control no transgénico. Esto sugiere que la especificidad de estadio se había obtenido de este modo- aquí LA513 es letal larvario/embrionario, pero no es letal para adultos.

Tabla 8

Media de la duración de vida de los adultos LA513/+ transgénicos de <i>Drosophila</i>			
Línea	Media de tiempo de supervivencia post-eclosión, días	Desviación estándar	Número de Moscas
O513	40,3	12,3	66
M8	26,1	2,5	9
M13	29,5	9,9	47
F23	29,6	11,3	83
F24	19,9	10,0	9
w ¹¹¹⁸	22,2	8,6	88

Es posible explicar estos datos de longevidad proponiendo que las larvas acumulan tetraciclina alimentándose, y que retienen esta tetraciclina en la madurez, de forma que sobreviven como adultos incluso en la ausencia de tetraciclina en la dieta. Para examinar esto, se criaron moscas heterocigotas de LA513/+ (línea M13) como larvas con varias concentraciones de tetraciclina. Tras la eclosión, los adultos se transfirieron a una dieta carente de tetraciclina y se midió la duración de la vida de estos adultos, como anteriormente. Como se muestra en la Tabla 9, a continuación, la concentración de la tetraciclina de la dieta mientras eran larvas no tiene un efecto obvio sobre la longevidad de los adultos subsecuentes en ausencia de tetraciclina, lo que implica que la supervivencia de los adultos no se debe primariamente a la retención de tetraciclina durante la alimentación de las larvas. A una concentración de 1 µg/ml, ningún transgénico sobrevivió hasta la madurez, y a 3 µg/ml solo sobrevivió hasta la madurez aproximadamente la mitad del número esperado, por lo que esta concentración está cerca del mínimo para la supervivencia de las larvas.

Tabla 9

Efecto de la tetraciclina de las larvas en la longevidad de los adultos			
Tetraciclina de las larvas µg/ml	Media de tiempo de supervivencia post-eclosión, días	Desviación estándar	Número de Moscas
1	-	-	-
3	33,5	13,2	9
10	28,4	9,6	17
30	26,3	11,3	23
100	29,5	9,9	47

Otra posible explicación para la supervivencia de los adultos LA513/+ es que el tTAV sea inactivo en adultos, por lo que el ciclo de retroalimentación positiva no funciona, y el tTAV no se acumula. Examinamos esto midiendo la cantidad de ARNm tTAV por PCR cuantitativa a continuación de una reacción de transcriptasa inversa (rt-PCR cuantitativa, o qPCR). Utilizamos química Taqman y reactivos (ABI), y un instrumento de QPCR ABI Prism 7000. Cada muestra se ensayó por triplicado: los datos son la media de estos tres ensayos. Los cebadores 18S se hibridaron al ARN18S de *Drosophila melanogaster*, *Geratitis capitata* y *Aedes aegypti*, entonces estos cebadores se utilizaron para las tres especies.

Cebadores utilizados:

18S RNA	SEC ID N°
Cebador directo: ACGCGAGAGGTGAAATTCTTG	4
Cebador inverso: GAAAACATCTTTGGCAAATGCTT	5
Sonda TaqMan MGB: 6-Fam-CCGTCGTAAGACTAAC-MGB	6
tTAV	
Cebador directo: CATGCCGACGCGCTAGA	7
Cebador inverso: TAAACATCTGCTCAAACCTCGAAGTC	8
Sonda TaqMan MGB: VIC-TCGATCTGGACATGTTGG-MGB	9

Encontramos que los 0513 criados con 100 µg/ml de tetraciclina tenían una relación tTA: 18S de 0,00016 (larvas) y 0,00013 (adultos). Los adultos que provenían de larvas con 100 µg/ml de tetraciclina, pero que se transferían a una dieta sin tetraciclina cuando eran adultos tenían unas relaciones de 0,0061, 0,0047, 0,0087 y 0,011 después de 1, 2,

4 y 8 días sin tetraciclina respectivamente. Este aumento de 28 y 64 veces en la expresión con respecto a los controles alimentados con tetraciclina indica que el sistema de expresión con retroalimentación positiva basada en tTAV es funcional en adultos.

5 EJEMPLO 6

LA513 en *Aedes aegypti*

10 Se transformaron mosquitos *Aedes aegypti* (el mosquito de la fiebre amarilla, también el vector principal del dengue febril urbano) con LA513. Se obtuvieron dos líneas independientes de inserción, la LA513A y la LA513B.

15 A los machos heterocigotos por LA513A (criados como larvas con 30 µg/ml de tetraciclina) se les dejó aparearse con hembras tipo silvestre. Se recogieron los huevos y las larvas resultantes se criaron en medio normal, o en medio suplementado con tetraciclina (Tc) a 30 µg/ml. Se determinó el número de adultos transgénicos y no transgénicos resultantes de esos huevos. Los datos son la suma de al menos 5 experimentos. Las larvas se criaron con una densidad de ≤ 250 individuos por litro; todos los huevos de los experimentos “sin tetraciclina” se lavaron dos veces antes de la sumersión para evitar la transferencia de tetraciclina. Para los experimentos “con tetraciclina”, se suplementaron la sangre parental y el agua azucarada con 30 µg/ml de tetraciclina; mientras que para los experimentos “sin tetraciclina” no. El ensayo χ^2 para la diferenciación en la relación entre la supervivencia de adultos transgénicos y de tipo silvestre: “con tetraciclina”, en cualquier orientación: $p > 0,05$; “sin tetraciclina” en cualquier orientación $p < 0,001$ (hipótesis nula: el genotipo con respecto a LA513 no tiene efecto sobre la supervivencia).

25 Por tanto, LA513A es dominante letal que se puede reprimir, con una penetración en estos experimentos el 95-97 %. El LA513B también es dominante letal que se puede reprimir, con una penetración en estos experimentos del 100 %. Los resultados se muestran en la Tabla 10, a continuación.

Tabla 10

Efecto de tetraciclina en la supervivencia de <i>Aedes aegypti</i> LA513/+ y sus hermanos +/+									
Parentales		Descendencia							
Macho	Hembra		Tc en larvas	Genotipo					
Huevos					1 ^{er} estado larvario	2 ^o	3 ^o	4 ^o	Pupa Adultos
LA513A/+	+/+	1000	Sí	LA513A/+	489	468	446	442	437 434
				Tipo silvestre	444	431	403	400	396 392
+/+	LA513A/+	1000	Sí	LA513A/+	442	420	404	399	393 383
				Tipo silvestre	466	444	428	417	412 404
LA513A/+	+/+	540	No	LA513A/+	274	265	235	208	155 7
				Tipo silvestre	233	225	214	212	209 206
+/+	LA513A/+	497	No	LA513A/+	216	205	181	168	131 9
				Tipo silvestre	241	225	216	214	211 207

Efecto de tetraciclina en la supervivencia de <i>Aedes aegypti</i> LA513/+ y sus hermanos +/+									
Parentales		Descendencia							
Macho	Hembra		Tc en larvas	Genotipo					
Huevos					1 ^{er} estado larvario	2 ^o	3 ^o	4 ^o	Pupa Adultos
LA513B/+	+/+	377	Sí	LA513B/+	161	153	147	141	139 131
				Tipo silvestre	178	171	165	160	157 153
+/+	LA513B/+	442	Sí	LA513B/+	189	181	170	166	161 153
				Tipo silvestre	203	198	185	182	180 176
LA513B/+	+/+	188	No	LA513B/+	69	19	0	0	0 0
				Tipo silvestre	85	84	83	83	82 81

+/+	LA513B/+	497	No	LA513B/+ Tipo silvestre	91 107	60 104	0 99	0 98	0 95	0 93
-----	----------	-----	----	----------------------------	-----------	-----------	---------	---------	---------	---------

Examinamos la supervivencia de los machos LA513A/+ que habían sido criados con tetraciclina (30 µg/ml), cuando eran larvas, pero a los que no se les dio tetraciclina cuando fueron adultos. Encontramos que todos los machos ensayados sobrevivieron durante tres semanas, independientemente del genotipo (LA513A/LA513A, LA513A/+ o +/+) o de la presencia o ausencia de tetraciclina en su dieta (n ≥ 40 para cada genotipo).

Investigamos las cinéticas de inducción de tTAV en mosquitos adultos LA513B/+ después de la retirada de la tetraciclina utilizando qPCR. Como se muestra en la Tabla 11, a continuación, el tTAV aumentaba en machos y hembras tras la retirada de tetraciclina. La inducción de la expresión de tTA es bastante rápida tras eliminar la Tc, como en la *Drosophila*. En cada caso, el cambio entre las dietas que contenían diferentes niveles de tetraciclina proporciona un nivel de control sobre el nivel de expresión de los genes controlados por tTA (ejemplificado aquí por el mismo tTA), utilizando tal sistema de retroalimentación positiva.

Tabla 11

Inducción de la expresión de tTA en machos LA513B/+ después de la retirada de tetraciclina

Sexo	Tiempo (días) sin tetraciclina	Relación de expresión tTA:18S	Expresión de tTA:18S con respecto a machos con tetraciclina
Macho	0	0,00036	1
Hembra	0	0,00060	1,7
Macho	3	0,0043	12
Hembra	3	0,014	38
Macho	4	0,054	150
Hembra	4	0,019	530
Macho	8	0,012	34
Hembra	8	0,52	1500
Macho	16	0,10	280
Hembra	16	0,032	88

EJEMPLO 7

Potenciación reprimible por tetraciclina de un promotor cercano por tTAV en una configuración de retroalimentación positiva

Observamos que el marcador fluorescente en mosquitos transgénicos LA513A y LA513B mostraba un patrón diferente en ausencia de tetraciclina, cuando se comparaba con el patrón en presencia de tetraciclina. La fluorescencia en presencia de tetraciclina era típica de la expresión dirigida por Actin5C en mosquitos (Catteruccia y col., 2000; Pinkerton y col., 2000), y limitada sobre todo a la parte hinchada del tórax. Por el contrario, en ausencia de tetraciclina, la expresión era mucho más fuerte y evidente sustancialmente por todo el cuerpo de los individuos transgénicos. En cada caso, la evaluación de la intensidad de la fluorescencia y el patrón de expresión se hizo por observación visual utilizando microscopía de fluorescencia.

La expresión de tTAV en esta situación de retroalimentación positiva parece, por tanto, que estimula la expresión del promotor cercano Actin5C. Esto se ilustra, en forma de diagrama en la Figura 9. También descubrimos que la concentración intermedia de tetraciclina, se ajustaba sustancialmente a la supresión de la letalidad de LA513, y no suprimía este patrón de expresión amplio de fluorescencia. A esas concentraciones intermedias de tetraciclina, se acumulaba el tTAV a un nivel intermedio – subletal, pero mayor que con 30 µg/ml de tetraciclina, y que aún influenciaba la expresión de DsRed2. Esto ejemplifica de nuevo el control adicional disponible modulando la concentración de tetraciclina.

La Figura 9 ilustra la acción bidireccional de tetO₇ en mosquitos 513A y 513B. En 513, el DsRed2 está bajo el control de transcripción del promotor Actin5C de *Drosophila*.

(A) En presencia de tetraciclina, se produce relativamente poco tTAV, que se une a la tetraciclina y que no tiene o tiene poco efecto sobre la expresión de DsRed2. Se ve DsRed2 en un patrón típico de la expresión de Actin5C en mosquitos.

(B) En ausencia de tetraciclina, tTAV estimula su propia expresión en un bucle de retroalimentación positiva.

(C) tTAV se une a los sitios tetO y aumenta la expresión del promotor mínimo hsp70, y por tanto de tTAV, pero también del promotor Actin5C, y por tanto de DsRed2.

EJEMPLO 8**LA656, LA928 y LA1124 en *Ceratitis capitata***

- 5 No se obtuvieron líneas transgénicas de la mosca mediterránea de la fruta (mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*), utilizando pLA513, probablemente indicando que el marcador basado en Actin5C de pLA513 no es apropiado para su uso en mosca mediterránea de la fruta. Esto enfatiza el deseo de que haya construcciones de expresión con un intervalo amplio de especies. Nosotros, por tanto, modificamos la construcción para incluir un
- 10 construcción es pLA656. También hicimos dos construcciones adicionales, pLA928, y pLA1124 (SEC ID N^{os} 18, 20 y 21, respectivamente, y que se muestra en forma de diagrama en las Figuras 10, 11, y 12), utilizando un marcador basado en el potenciador hr5 y el promotor ie1 de un baculovirus (virus de poliedrosis nuclear *Autographica californica*, AcMNPV). Este se diferencia en la orientación del marcador con respecto al casete tetO-tTAV. El potenciador hr está más próximo al casete tetO-tTAV en pLA1124 que en pLA928. Además, el pLA1124 tiene 21, en vez de 7, copias de tetO y adicionalmente tiene una región GAGA-factor de unión aparente relacionada con la de pUASp (Roth, 1998).

Se obtuvo una línea transgénica por pLA656, tres por pLA928 y tres por pLA1124. Se asumió que estas líneas tienen inserciones independientes, ya que se derivaron de diferentes G0 supervivientes de la inyección.

- 20 Se cruzaron machos heterocigotos de cada línea con hembras tipo silvestre. La descendencia se crio con una dieta de referencia para *Drosophila* de levadura/azúcar/germen de trigo o levadura/azúcar/maíz, suplementada apropiadamente con tetraciclina. Los parentales se mantuvieron con la misma dieta, suplementada con 100 µg/ml de tetraciclina en el caso de los machos transgénicos. Las hembras del tipo silvestre con las que se aparearon los
- 25 machos se mantuvieron sin tetraciclina, para eliminar cualquier contribución potencial materna de tetraciclina. Se determinó el número de pupas y adultos transgénicos y no transgénicos obtenidos en cada cruzamiento clasificándolos por el DsRed2 mediante microscopía de fluorescencia.

- 30 Los resultados de estos cruzamientos se muestran en la Tabla 12, a continuación. En cada caso, en ausencia de tetraciclina, la supervivencia de los heterocigotos transgénicos era menor del 2 % en relación con su tipo silvestre. El cambio entre las dietas que contenían diferentes niveles de tetraciclina, la modificación de la construcción y el efecto del uso de una posición, se tratan en otra parte del presente documento.

Tabla 12

Efecto de la tetraciclina sobre las moscas mediterráneas de la fruta heterocigotas transgénicas por varias construcciones y sus hermanos +/-								
LA656	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	84/1161	7	6	2	530	551	0,7
	0,1	16/423	4	0	0	205	177	0
	1	124/384	32	34	12	155	174	14
	3	258/370	70	84	53	165	133	46
	10	249/252	99	91	98	107	127	81
	100	330/307	107	151	150	134	148	107
LA928m1	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	28/1499	1,87	5	1	661	639	0,46
	0,1	0/765	0	0	0	347	246	0
	1	190/256	74	62	59	119	101	55
	3	290/302	96	133	98	143	107	92
	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	100	222/286	77	84	84	146	126	74
LA928m3	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	68/1026	6,6	13	4	489	449	1,8
	0,1	0/265	0	0	0	117	91	0
	1	358/446	80	154	100	228	164	65

	3	105/105	100	39	35	42	38	93
	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	100	245/245	100	109	121	117	108	100
<u>LA928F1</u>	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	17/1331	1,3	2	0	639	599	0,16
	0,1	2/254	0,8	0	0	100	84	0
	1	461/567	81	218	146	244	181	85
	3	520/527	99	214	182	249	202	88
	10	350/399	91	139	112	131	159	87
	100	126/117	108	63	57	57	49	113
<u>LA1124f1</u>	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	104/213	51	0	3	95	62	1.9
	100	478/536	89	218	208	205	203	104
<u>LA1124m1</u>	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	337/437	77	2	1	176	207	0,78
	100	84/90	93	35	31	30	26	118
<u>LA1124m2</u>	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	104/145	72	0	1	46	34	1,3
	100	77/77	100	24	14	19	13	119
F: fluorescente NF: no fluorescente								

Se recolectaron las pupas y se valoró su fluorescencia (columna 3), entonces se les dejó eclosionar. Se evaluaron la fluorescencia y el sexo (columnas 5-8) de los adultos supervivientes. A partir de estos datos en adultos, se calculó la relación entre supervivientes fluorescentes y no fluorescentes, y se presenta en la columna 9 como el porcentaje de adultos fluorescentes observados en relación con los no fluorescentes. Se esperaba que estos cruzamientos darian, de media, igual número de individuos transgénicos y no transgénicos; de esta forma si sobreviven hasta la madurez la misma proporción de individuos transgénicos y no transgénicos, entonces debería dar una "relación de supervivencia de adultos" del 100 %.

- 10 Además investigamos la expresión de tTA en estas líneas transgénicas por PCR-rt (tiempo real) cuantitativa (qPCR). Los resultados se dan en la Tabla 13, a continuación.

Tabla 13

Niveles de expresión de tTA en mosca mediterránea de la fruta tipo silvestre y transgénicas

Muestra	Relación tTA/18S	Relación NT/T
<i>Larvas</i>		
WT tet	3,13E-06	
WT NT	2,81E-06	
656 tet	5,80E-06	1,00
656 NT	2,06E-04	36
670A tet	2,71E-06	1,00
670A NT	1,10E-04	41
670e tet	9,70E-06	1,00
670e NT	8,40E-05	8,7
<i>Adultos</i>		
Hembra WT	2,83E-06	
Macho WT	2,16E-07	
Heterocigotos		
656 tet M 0d	5,52E-06	1,00

656 tet M8d	1,12E-05	2,0
656 NT M 0d	4,49E-05	8,1
656 NT M 2d	2,77E-04	50
656 NT M 4d	2,22E-04	40
656 NT M 8d	9,71E-05	18
656 NT M 16d	1,49E-04	27
670 M tet	4,21E-06	1,00
670 F tet	2,86E-06	0,68
670 M NT S	6,93E-05	16,45
670 F NT S	1,92E-04	45,57
928Am1 F tet	7,17E-06	1,00
928Am1 M tet	8,56E-06	1,19
928Am1 M NT 2d	1,71E-04	23,81
928Am1 M NT 4d	5,36E-04	74,72
928Am1 M NT 8d	1,91E-04	26,66
928Am1 M NT 16d	1,01E-05	1,41
928Am1 M tet 8d	1,11E-06	0,16
928Am1 M NT S	2,22E-04	31,02
928Am1 M NT S	1,51E-04	21,11
928Am3 F tet	9,09E-07	1,00
928Am3 M tet	9,09E-07	1,00
928Am3 F NT S	3,62E-05	39,85
928Am3 F NT S	8,74E-04	962,07
928Am3 F NT S	2,99E-04	329,32
928Am3 M NT S	5,53E-05	60,83
928Am3 M NT S	9,18E-04	1009,90
1124f1 F tet	2,86E-05	1,00
1124f1 F NT 7d	4,11E-04	14,35
1124m1 M tet	1,62E-05	1,00
1124m1 F NT S	9,30E-04	57,55
1124m2 F tet	8,98E-05	1,00
1124m2 F NT 7d	7,90E-04	8,79
Homocigotos		
656 tet 8d	1,49E-05	1,00
656 NT 0d	9,23E-05	6,2
656 NT 2d	3,90E-03	262
656 NT 4d	1,92E-03	129
656 NT 8d	4,70E-03	316
656 NT 16d	8,58E-04	58
M: Sexo masculino;		
F: Sexo femenino;		
tet: Criado con una dieta suplementada con 100 µg/ml de tetraciclina;		
NT S: Criado con dieta de referencia (0 µg/ml de tetraciclina);		
d: días post eclosión;		
NT (n)d: alimentados con dieta tet, cuando llegan a adultos con dieta no tet (NT)		
durante n días, como se indica;		
tet (n)d: alimentados con dieta tet, cuando llegan a adultos con dieta tet		
durante n días, como se indica		

EJEMPLO 9

LA670 en *Ceratitis capitata*

5 Obtuvimos una sola línea transgénica de mosca mediterránea de la fruta por transformación con pLA670, una construcción que se parecía mucho a pLA656. Este plásmido se ilustra en la Figura 13 adjunta, y es la SEC ID N° 23.

Sin embargo, esta línea transgénica dio una cantidad significativa de descendientes adultos transgénicos, incluso cuando se criaron con una dieta carente de tetraciclina cuando eran larvas (Tabla 14). Sin embargo esta línea de inserción LA670 produce una cantidad fácilmente detectable de ARNm tTAV en ausencia de tetraciclina, que se reduce sustancialmente por la tetraciclina de la dieta (evaluado por qPCR, los resultados se muestran en la Tabla 13 anterior). Por tanto, LA670 representa una fuente regulable útil de tTAV con la cual controlar la expresión de los genes que responden a tTAV. La diferencia fenotípica entre LA656 y LA670, que son extremadamente similares en su estructura, es debida probablemente al efecto de posición., que es la variación en la expresión de los transgenes dependiendo de donde están insertados en el genoma. Tal variación se muestra también por la variación de fenotipo y los niveles de expresión de tTAV entre diferentes líneas transgénicas con la misma construcción, como se muestra en la Tabla 13, anterior. Por tanto, se proporciona un procedimiento simple para obtener líneas transgénicas que porten construcciones de retroalimentación positiva con diferentes niveles de expresión y consecuencias fenotípicas, que comprende la generación de un panel de líneas de inserción y selección de los niveles y patrones de expresión reprimida y basal.

Tabla 14

Efecto de la tetraciclina sobre las moscas mediterráneas de la fruta heterocigotas transgénicas por LA670, y sus hermanos +/-								
LA670	Descendencia [Tc] (µg/ml)	Pupas F/NF	Relación de supervivencia pupal (%)	Macho F	Hembra F	Macho NF	Hembra NF	Relación de supervivencia de adultos (%)
	0	182/220	83	72	35	102	103	52
	100	10/8	125	5	3	5	3	100
F: fluorescente NF: no fluorescente								

Se recogieron las pupas y se valoró la fluorescencia (columna 3), entonces se les dejó eclosionar. Se evaluaron la fluorescencia y el sexo (columnas 5-8) de los adultos supervivientes. A partir de estos datos en adultos, se calculó la relación entre supervivientes fluorescentes y no fluorescentes, y se presenta en la columna 9 como el porcentaje de adultos fluorescentes observados en relación con los no fluorescentes. Se esperaba que estos cruzamientos dieran, de media, igual número de individuos transgénicos y no transgénicos; de esta forma si sobreviven hasta la madurez la misma proporción de individuos transgénicos y no transgénicos, entonces debería dar una "relación de supervivencia de adultos" del 100 %.

Ensayamos la capacidad de LA670 para dirigir la expresión de secuencias situadas bajo del control de la transcripción de tetO. Analizamos la expresión de dos ARNm potenciales de pLA1038 (Figura 14, SEC ID N° 24), que contiene dos unidades de transcripción que responden a tTA, transcritas divergentemente. Estos son CMV-tTA y hsp70-Cctra-nipper. Se llevó a cabo un análisis por PCR, con controles, de la expresión de estas unidades de transcripción en presencia y ausencia de pLA670. Ambas unidades de transcripción se expresan en presencia de pLA670. CMV-tTA se expresa a un nivel más bajo pero detectable en transgénicos LA1038/+ en ausencia de LA670. La hsp70-Cctra-nipper no se expresaba detectablemente en ausencia de pLA670, lo que muestra que la expresión además está controlada por, y depende de, la tTAV suministrada por pLA670.

EJEMPLO 10**LA710 en *Pectinophora gossypiella***

La *Pectinophora gossypiella* (gusano rosado o lagarta rosada, un lepidóptero) se transformó con LA710 (Figura 15, SEC ID N° 19) por procedimientos de referencia (Peloquin, y col., 2000). Se recuperaron cuatro líneas transgénicas. Los machos de esta línea se cruzaron con hembras de tipo silvestre para LA710. Las larvas recién nacidas se situaron en viales individuales de 1,7 ml con una dieta, o bien con o sin 7-clortetraciclina (40 µg/ml), y se valoró su fluorescencia. No se observó ninguna diferencia significativa en el número de transgénicos supervivientes en la madurez con respecto al número de sus hermanos de tipo silvestre, tanto con o sin clortetraciclina. Concluimos que LA710 no produce normalmente la acumulación de niveles letales de tTAV, incluso en ausencia de clortetraciclina en la dieta.

Examinamos la expresión de ARNm tTAV en los transgénicos LA710 por PCR a continuación de una reacción de transcriptasa inversa (rt-PCR). Encontramos que no era detectable el ARNm tTAV en las larvas alimentadas con clortetraciclina, pero era detectable en las larvas que no habían recibido la clortetraciclina (datos no mostrados). Esta construcción de retroalimentación positiva, por lo tanto, proporciona en estas polillas, una fuente de tTAV que se puede regular por el suministro en la dieta de clortetraciclina, y para la que la expresión no reprimida, aunque detectable fácilmente, no es letal. También observamos una variación significativa en la intensidad de la banda correspondiente al ARNm tTAV en muestras de diferentes líneas.

EJEMPLO 11**LA1124 en *Pectinophora gossypiella***

- 5 La *Pectinophora gossypiella* (gusano rosado o lagarta rosada, un lepidóptero) se transformó con LA1124 (Figura 12, SEC ID N° 21) por procedimientos de referencia (Peloquin, y col., 2000). Se recuperó una única línea transgénica. Los machos de esta línea se cruzaron con hembras de tipo silvestre para LA1124. Las larvas recién nacidas se situaron en viales individuales de 1,7 ml con una dieta, o bien con o sin 7-clortetraciclina (40 µg/ml), y se valoró su fluorescencia. Estas larvas se evaluaron de nuevo cuando tenían un tiempo de desarrollo de último estadio larvario.
- 10 Todas las larvas sobrevivieron, excepto las larvas fluorescentes (LA1124/+) con la dieta que carecía de clortetraciclina, como se muestra en la Tabla 15, a continuación.

Tabla 15

Gusano rosado: supervivencia desde el estadio temprano hasta el último, de LA1124/+ o sus hermanos de tipo silvestre, con una dieta con o sin clortetraciclina			
Clortetraciclina 100 µg/ml		Clortetraciclina 0 µg/ml	
LA1124/+	Tipo silvestre	LA1124/+	Tipo silvestre
3 (0 muertes)	11 (0 muertes)	8 (8 muertes)	7 (0 muertes)

- 15 Examinamos la expresión de ARNm tTAV en los gusanos rosas del algodón LA1124 por PCR a continuación de una reacción de transcriptasa inversa (rt-PCR). Encontramos que el ARNm tTAV se detectaba fácilmente en las larvas alimentadas con clortetraciclina, y estaba elevado considerablemente en las larvas que no habían recibido la clortetraciclina (datos no mostrados). La expresión basal significativa de ARNm tTAV en esta construcción se debe probablemente a la inclusión en LA1124 del potenciador hr, que se incluyó por esta razón. La comparación de la estructura y función de LA1124 y la de LA710 ilustra claramente que los niveles basal y máximo del producto génico
- 20 se pueden seleccionar fácilmente, modificando apropiadamente la construcción de expresión, este principio se demuestra, aquí, regulando los niveles de expresión de un ARN dependiente de tTAV (en este caso el ARNm tTAV).

EJEMPLO 12**25 Expresión específica del sexo utilizando retroalimentación positiva**

- Se prefiere controlar, por el diseño, la expresión de tTAV a partir de una construcción de retroalimentación positiva, de forma que se puede expresar deferencialmente en diferentes tejidos, o en diferentes estadios de desarrollo, o diferentes sexos, por ejemplo. Una aplicación para esto es en la determinación del sexo genético, en el que se induce un dimorfismo sexual entre los dos sexos y que se utiliza como base para separar los dos sexos. En el contexto de la Técnica de insectos Estériles, por ejemplo, para la mosca mediterránea de la fruta, esto significa preferentemente matar las hembras, más preferentemente en un estadio temprano de su desarrollo. No se conocen promotores de actuación temprana específicos de hembras para mosca mediterránea de la fruta, lo cual limita el potencial del sistema de dos componentes dominante letal que se puede reprimir, ejemplificado para *Drosophila*, que utiliza promotores o potenciadores de genes de proteína de yema de huevo (Heinrich y Scott, 2000; Thomas y col., 2000). Sería claramente ventajoso ser capaces de combinar las características beneficiosas de un sistema de retroalimentación positiva condicional con un mecanismo que confiriera la especificidad femenina.

- 40 Por tanto, modificamos una construcción de retroalimentación positiva no específica del sexo insertando una región intrónica específica del sexo de Ccra, el homólogo en la mosca mediterránea de la fruta del gen transformador de *Drosophila melanogaster* (Pane y col., 2002). El corte y empalme específico del sexo de Ccra se ilustra en forma de diagrama en la Figura 16, que se ha adaptado de Pane y col., 2002, mencionado anteriormente. La Figura 16 muestra la organización genómica del gen *tra* de la mosca mediterránea de la fruta. La línea superior representa el locus genómico Ccra. Los exones se muestran como bloques, aug marca el codón de inicio compartido. Las uniones alternadas de corte y empalme se marcan como i. Los sitios de unión aparentes tra/tra-2 se marcan con puntas de flecha. La transcripción F1, es el único que codifica proteína Ccra funcional, y es específico de hembras. Las transcripciones M1 y M2 se encuentran tanto en machos como en hembras.

- 50 Se producen tres transcripciones principales: M1, M2 y F1. La transcripción F1 se encuentra solamente en hembras, y es el único que codifica la proteína Ccra funcional, de longitud completa. Las transcripciones M1 y M2 se encuentran tanto en machos como en hembras, e incluyen una secuencia exónica adicional, que inserta uno o más codones de parada relativos a la transcripción F1, dando lugar a que se trunque la fase de lectura abierta.

- 55 Insertamos el intrón Ccra en la fase de lectura abierta de tTAV, de forma que la escisión por corte y empalme del intrón completo, en forma de transcripción F1, debería reconstituirse en una región codificadora intacta tTAV, pero cortando y empalmado en la manera de M1 o M2 resultaría en una proteína truncada incapaz de actuar como un potenciador de la transcripción. El plásmido resultante pLA1188 (Figura 17, SEC ID N° 22), se inyectó en los embriones de mosca mediterránea de la fruta. Se recuperaron las larvas supervivientes, y se analizaron extractos de estas larvas por rt-PCR para determinar el patrón de corte y empalme de la transcripción tTAV.

Las larvas hembras rendían productos PCR que correspondían a los tamaños esperados que resultarían del corte y empalme en el patrón del gen *Cctra* endógeno, en otras palabras correspondiendo al corte y empalme en los patrones M1, M2 y F1. Estos datos indican que el intrón *Cctra* puede cortar y empalmar correctamente en un contexto heterólogo, y por tanto, proporcionar un procedimiento adecuado para introducir una especificidad del sexo en una construcción de retroalimentación positiva. Además, como se conservó la función de *tra* a lo largo de un intervalo filogenético amplio (Saccone y col., 2002), y se conocen otros intrones específicos del sexo, por ejemplo, en *Drosophila melanogaster* el gen de sexo *doble* (*dsx*), que también se conserva bien, proporciona un procedimiento general para manipular la expresión de genes. Será aparente para la persona experta en la técnica que tales manipulaciones pueden alternativamente, o adicionalmente, aplicarse a otros genes que responden a un activador de la transcripción, de forma que se puede conseguir la expresión específica del sexo de un gen diana combinando la expresión no específica del sexo de un activador de la transcripción con la expresión específica del sexo, por ejemplo, por medio de corte y empalme de un ARN funcional bajo el control de la transcripción del activador de la transcripción. Además, será también aparente que esto proporciona un mecanismo simple para la expresión diferencial de dos, o más, genes diana diferentes, o productos génicos, tal que uno, o un grupo, se exprese en ambos sexos y el otro, u otro grupo, en un solo sexo. Esto se ilustra para la mosca mediterránea de la fruta en la Figura 18.

Los cebadores utilizados fueron:

Tra(tTAV)Sec+: 5'-CCTGCCAGGACTCGCCTTCC (SEC ID N° 12)
Tra(tTAV)Sec-: 5'-GTCATCAACTCCGCGTTGAGC (SEC ID N° 13)

Se produjeron productos RT-PCR de ~600 y ~200 pb cuando el ADNc derivado de hembras de mosca mediterránea de la fruta 1 y 2 se utilizaron como matriz, representando respectivamente formas cortadas y empalmadas de ARNm específicas de "macho" (M1 y M2) y específicas de hembras (F1) (datos no mostrados). El producto de ~200 pb puede que se produjera debido a la contaminación con ADN tTAV - la forma femenina de corte y empalme eliminaba completamente el intrón *Cctra* y por tanto llevaba a un producto PCR que es idéntico al que se debería obtener de cualquiera de los varios plásmidos que contienen tTAV o las muestras manejadas en el mismo laboratorio. La banda de ~600 pb, por el contrario, retiene ~400 pb de la secuencia *Cctra* y es diagnóstica del correcto corte y empalme de la construcción.

En otro experimento (datos no mostrados), se analizó la expresión de las transcripciones de LA1038 en respuesta a tTAV de LA670 por cromatografía en gel (datos no mostrados), utilizando:

A: rt-PCR para la expresión de CMV-tTA de LA1038 en extractos de heterocigotos dobles LA1038/+, LA670/+;
B: rt-PCR para la expresión de hsp70-*Cctra*-nipper en extractos de heterocigotos dobles LA1038/+, LA670/+; y
C: rt-PCR para la expresión de CMV-tTA de LA1038 en extractos de heterocigotos LA1038/+ sin LA670.

Todas las moscas se criaron en ausencia de tetraciclina en la dieta. En A y C, se presentaron dos bandas entre 200 pb y 400 pb y representaban el ADNc del ARNm cortado y empalmado (la banda de bajo peso molecular) y el ADN genómico o el ADNc del mensaje sin cortar y empalmar (la banda de mayor peso molecular) respectivamente. En B, una banda de aproximadamente 200 pb representa el ADNc del ARNm cortado y empalmado en el patrón de la transcripción de *Cctra* específica de hembra, una banda superior de aproximadamente 1500 pb que representa el ADN genómico o el ADNc del mensaje sin cortar y empalmar, y bandas de tamaño intermedio que representan el ADNc cortado y empalmado en el patrón de las transcripciones M1 y M2 de *Cctra* no específicas de sexo, o bandas no específicas.

Las secuencias cebadoras utilizadas fueron.

hsp70-*Cctra*-nipper: NIP: 5'-CATCGATGCCCAGCATTGAGATG y
HSP: 5'-CAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTA;
CMV-tTA: CMV: 5'-GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAG y
TTA: 5'-GCCAATACAATGTAGGCTGCTCTACAC

Estos datos (no mostrados) demuestran que la sección hsp-*Cctra*-nipper de LA1038 demuestra que se cortó y empalmó correctamente en la forma femenina en 6/6 hembras, y en la forma masculina en 6/6 machos.

Secuencias de referencia:

JY2004-tTA (SEC ID N° 14) – secuencia solamente de la región tetO7-tTA
pP[Casper-Act5C-tTA] (SEC ID N° 15)
pLA513 (SEC ID N° 16)
pLA517 (SEC ID N° 17)
pLA656 (SEC ID N° 18)
pLA670 (SEC ID N° 23)
pLA710 (SEC ID N° 19)

pLA928 (SEC ID Nº 20)
pLA1038 (SEC ID Nº 24)
pLA1124 (SEC ID Nº 21)
pLA1188 (SEC ID Nº 22)

Referencias

- Alphey, L. (2002). Re-engineering the Sterile Insect Technique. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1243-1247.
- Alphey, L., y Andreassen, M. H. (2002). Dominant lethality and insect population control. *Mol Biochem Parasitol* 121, 173-178.
- Alphey, L., Beard, B., Billingsley, P., Coetzee, M., Crisanti, A., Curtis, C. F., Eggleston, P., Godfray, C., Hemingway, J., Jacobs-Lorena, M., y col. (2002). Malaria control with genetically modified vectors. *Science* 298, 119-121.
- Baron, U., y Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Meth Enzymol* 327.
- Baron, U., Gossen, M., y Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucl Acids Res* 25, 2723-2729.
- Bello, B., Resendez-Perez, D., y Gehring, W. (1998). Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development* 125, 2193-2202.
- Benedict, M., y Robinson, A. (2003). The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol* 19, 349-355.
- Bennett, D., Szoor, B., Gross, S., Vereshchagina, N., y Alphey, L. (2003). Ectopic expression of inhibitors of Protein Phosphatase type 1 (PP1) can be used to analyse roles of PP1 in *Drosophila* development. *Genetics* 164, 235-245.
- Berger, S. L., Cress, W. D., Cress, A., Triezenberg, S. J., y Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61, 1199-1208.
- Berghammer, A. J., Klingler, M., y Wimmer, E. A. (1999). A universal marker for transgenic insects. *Nature* 402, 370-371.
- Brand, A., Manoukian, A., y Perrimon, N. (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Meth Cell Biol* 44, 635-654.
- Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F., y Crisanti, A. (2000). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405, 959-962.
- Coates, C., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., y James, A. (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3748-3751.
- Damke, H., Gossen, M., Freundlieb, S., Bujard, H., y Schmid, S. (1995). Tightly regulated and inducible expression of dominant interfering dynamin mutant in stably transformed HeLa cells. *Meth Enz* 257, 209-220.
- Fussenegger, M. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog* 17, 1-51.
- Fussenegger, M., Mazur, X., y Bailey, J. (1998a). pTRIDENT, a novel vector family for tricistronic expression in mammalian cells. *Biotech Bioeng* 57, 1-10.
- Fussenegger, M., Moser, S., y Bailey, J. (1998b). pQuattro vectors allow one-step transfection and auto-selection of quattrocistronic artificial mammalian operons. *Cytotechnology* 28, 229-235.
- Gebauer, F., Merendino, L., Hentze, M. W., y Valcarcel, J. (1998). The *Drosophila* splicing regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. *RNA* 4, 142-150.
- Gill, G., y Ptashne, M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* 334, 721-724.
- Gossen, M., Bonin, A., Freundlieb, S., y Bujard, H. (1994). Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol* 5, 516-520.
- Gossen, M., y Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Handler, A. (2002). Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1211-1220.
- Handler, A., y James, A. (2000). *Insect transgenesis: methods and applications* (Boca Raton, CRC Press).
- Heinrich, J., y Scott, M. (2000). A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 97, 8229-8232.
- Horn, C., Schmid, B., Pogoda, F., y Wimmer, E. (2002). Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1221-1235.
- Jasinskiene, N., Coates, C., Benedict, M., Cornel, A., Rafferty, C., James, A., y Collins, F. (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3743-3747.
- Kelley, R. L., Solovyeva, I., Lyman, L. M., Richman, R., Solovyev, V., y Kuroda, M. I. (1995). Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* 81, 867-877.
- Lobo, N., Hua-Van, A., Li, X., Nolen, B., y Fraser, M. (2002). Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a *piggyBac* vector. *Insect Molecular Biology* 11, 133-139.
- Lozovsky, E., Nurminsky, D., Wimmer, E., y Hartl, D. (2002). Unexpected stability of mariner transgenes in

- Drosophila*. Genetics 160, 527-535.
- Matsuo, T., Takahashi, K., Kondo, S., Kaibuchi, K., y Yamamoto, D. (1997). Regulation of cone cell formation by Canoe and Ras in the developing *Drosophila* eye. Development 124, 2671-2680.
- McCombs, S., y Saul, S. (1995). Translocation-based genetic sexing system for the oriental fruit-fly (Diptera, Tephritidae) based on pupal color dimorphism. Ann Ent Soc Am 88, 695-698.
- 5 Moreira, L., Wang, J., Collins, F., y Jacobs-Lorena, M. (2004). Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit Plasmodium development. Genetics 166, 1337-1341.
- Pane, A., Salvemini, M., Delli Bovi, P., Polito, C., y Saccone, G. (2002). The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. Development 129, 3715-3725.
- 10 Parker, L., Gross, S., Beullens, M., Bollen, M., Bennett, D., y Alphey, L. (2002). Functional interaction between NIPP1 and PP1 in *Drosophila*: lethality of over-expression of NIPP1 in flies and rescue by the over-expression of PP1. Biochem J 368, 789-797.
- Peloquin, J. J., Thibault, S. T., Staten, R., y Miller, T. A. (2000). Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: gelechiidae) mediated by the *piggyBac* transposable element. Insect Mol Biol 9, 323-333.
- 15 Perera, O., Harrell, R., y Handler, A. (2002). Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a *piggyBac*-EGFP transposon vector is routine and highly efficient. Insect Molecular Biology 11, 291-297.
- Pinkerton, A., Michel, K., O'Brochta, D., y Atkinson, P. (2000). Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology 9, 1-10.
- 20 Reichhart, J., y Ferrandon, D. (1998). Green balancers. *Drosophila* Information Service 81, 201-202.
- Rorth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. Mech Dev 78, 113-118.
- Saccone, G., Pane, A., y Polito, C. (2002). Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. Genetica 116, 15-23.
- Salghetti, S., Caudy, A., Chenoweth, J., y Tansey, W. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. Science 293, 1651-1653.
- 25 Scott, M., Heinrich, J., y Li, X. (2004). Progress towards the development of a transgenic strain of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) suitable for a male-only sterile release program. Insect Biochem Mol Biol 34, 185-192.
- Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N., y Schatz, D. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. Proc Nat'l Acad Sci (USA) 92, 6522-6526.
- 30 Stebbins, M., y Yin, J. (2001). Adaptable doxycycline-regulated gene expression systems for *Drosophila*. Gene 270, 103-111.
- Thomas, D., Donnelly, C., Wood, R., y Alphey, L. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. Science 287, 2474-2476.
- 35 Varshavsky, A. (2000). Ubiquitin fusion technique and its descendants. Meth Enz 327.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Oxitec Limited
- <120> Control de Plagas
- <130> WPP88353
- 45 <150> UK 0317656.7
- <151> 28-07-2003
- <160> 33
- 50 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 44
- <212> ADN
- 55 <213> *Drosophila* sp.
- <400> 1
- cacagcgcat gatgagcaca ttaacaaaat gtagtaaaat agga 44
- 60 <210> 2
- <211> 44
- <212> ADN
- <213> *Drosophila* sp.
- 65 <400> 2
- gtttcgataa atattgctat ttaaaatgct tattttcaat gcta 44

<210> 3
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Drosophila* sp.
 5
 <400> 3
 ttgttttct aacgttaaag ttaaagagag tccagccaca tttt 44
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 15
 <400> 4
 acgcgagagg tgaaattctt g 21
 20
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 5
 gaaaacatct ttggcaaatg ctt 23
 30
 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Parte de nucleótido de sonda TaqMan MGB
 <400> 6
 ccgtcgtaag actaac 16
 40
 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 50
 <400> 7
 catgccgacg cgctaga 17
 <210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 60
 <400> 8
 gtaaacaatct gctcaaactc gaagtc 26
 65
 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Parte de nucleótido de sonda TaqMan MGB
 5
 <400> 9
 tcgatctgga catgttgg 18
 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 15
 <400> 10
 gccctcgatg gtagaccgt aattg 25
 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 25
 <400> 11
 gctaaacaat ctgcaggtac cctggcg 27
 30
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 12
 cctgccagga ctgccttcc 20
 40
 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 13
 gtcacaaact ccgcgttga gc 22
 50
 <210> 14
 <211> 2556
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> JY2004-tTA
 60
 <400> 14

gcggccgcac- agtcgacatt .tcgagtttac .cactccctat cagtgataga gaaaagtgaa	60
agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc	120
ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa	180
agtgaaagtc gagttttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaag tcgagtttac	240
cactccctat cagtgataga gaaaagtgaa agtcgagttt accactccct atcagtgata	300
gagaaaagtg aaagtcgagc tcggtacccg ggtcgaggta ggcgtgtacg gtgggaggcc	360
tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt	420
tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc gcggccccga attcgagctc	480
ggtacccggg gatccccgct cgagctgaat agggaaattg gaattggagc agaggtgggt	540
tcttcgcatt acactgttcg ccacaatctt gtttattcat tcgccttgca ggttgccacc	600
atggaattga gattagataa aagtaaagtg attaacagcg cattagagct gcttaatgag	660
gtcggaatcg aaggtttaac aacccgtaaa ctgcgccaga agctaggtgt agagcagcct	720
acattgtatt ggcattgtaa aaataagcgg gctttgctcg acgccttagc cattgagatg	780
ttagataggc accatactca cttttgcctt ttagaagggg aaagctggca agatttttta	840

cgtaataacg ctaaaagttt tagatgtgct ttactaagtc atcgcgatgg agcaaaagta 900
catttaggta cacggcctac agaaaaagag tatgaaactc tcgaaaatca attagccttt 960
ttatgccaac aagggttttc actagagaat gcattatatg cactcagcgc tgtggggcat 1020
tttacttttag gttgctgatt ggaagatcaa gagcatcaag tcgctaaaga agaaagggaa 1080
acacctacta ctgatatgat gccgccatta ttacgacaag ctatcgaatt atttgatcac 1140
caagggtgcag agccagcctt cttattcggc cttgaattga tcatatgcgg attagaaaaa 1200
caacttaaat gtgaaagtgg gtccgcgtac agccgcgcgc gtacgaaaaa caattacggg 1260
tctaccatcg agggcctgct cgatctcccg gacgacgacg cccccaaga ggcggggctg 1320
ggggctccgc gcctgtcctt tctccccgcg ggacacacgc gcagactgtc gacggcccc 1380
ccgaccgatg tcagcctggg ggacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg 1440
catgccgacg cgtatagacg tttcgatctg gacatgttgg gggacgggga tccccgggt 1500
ccgggattta cccccacg ctccgcccc tacggcgctc tggatatggc cgacttcgag 1560
tttgagcaga tgtttaccga tgcccttggg attgacgagt acggtgggta gtgaaacgcg 1620
tctagagctg agaacttcag ggtgagttt gggaccctt attgttcttt ctttttctgt 1680
attgtaaaat tcatgttata tggagggggc aaagttttca ggggtgttgt tagaatggga 1740
agatgtccct tgtatcacca tggaccctca tgataatttt gtttctttca ctttctactc 1800
tggtgacaac cattgtctcc tcttattttc ttttcatttt ctgtaacttt ttcgttaaac 1860
tttagcttgc atttgtaacg aatttttaaa ttcacttttg tttatttgtc agattgtaag 1920
tactttctct aatcactttt ttttcaaggc aatcagggtg tattatattg tacttcagca 1980
cagttttaga gaacaattgt tataattaaa tgataaggta gaatatttct gcatataaat 2040
tctggctggc gtggaaatat tcttatttgt agaaacaact acaccctggg catcatcctg 2100
cctttctctt tatggttaca atgatataca ctgtttgaga tgaggataaa atactctgag 2160
tccaaaccgg gccctctgc taaccatgtt catgccttct tctctttcct acagctcctg 2220
ggcaacgtgc tgggtgttgt gctgtctcat cattttggca aagaattcac tctcaggtg 2280
caggctgcct atcagaaggt ggtggctggg gtggccaatg ccctggctca caaataccac 2340
tgagatcttt ttcctctgc caaaaattat ggggacatca tgaagccctt tgagcatctg 2400
acttctggct aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttgga ttttttgtgt 2460
ctctcactcg gaaggacata tgggagggca aatcatttaa aacatcagaa tgagtatttg 2520
gttttagagtt tggcaacata tgcccatagc ggccgc 2556

<210> 15
<211> 12087
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> pP[Casper-Act5C-tTA]

<400> 15

```

gatccatgag caattagcat gaacgttctg aaaagcgcgt ttagctctcc actacttaca      60
catattctat gctgcaatat tgaaaatcta ataaacaaaa ctaatgtaca ttaattcttc      120
agttttgaat atccttctcc tgactttctt atttagaatt aatataatac tgcatacatt      180
aatactgtaa atatgataag tacctgcaaa aactgcagc tcaagtctta atgaggttct      240
gcgatagctt agcataatta gtaacttata gcgcagaatt ccctaagtgt cccgacctac      300
atgtacttct gatagttgcc gaggtcaaatt gttgttgat ttgtattata cctcaatatt      360
ggatatattca atatctaata gtacccaatt caattgcaaa gatagtcatt aaaaaaacct      420
aaatcacttg caaattgact tttctgccgg aaaagcaacc ttgacacaca aagttaatta      480
gtttatctgg aagtcattgt agaaatttgt aaataaaatt tttcgagta atttaagtgg      540
gcctaataccc ttttaagcat cttggtttta cgatgacacc gcaataaggt acaactttat      600
attgtttttg caatcagctt gagtctttat taggcatcag tcttctcttc taagtttctt      660
cgtgcaataa atgaggttcc aaactccgta gatttttctt tctttgttga atccagatcc      720
tgcaaagaaa aaagagcaaa cccctaggtc tgtccaggaa tgtattttcg tgtttgtcga      780
tcgaccatgg tctcgagagg ccttgacagc aagctttgag tactcgcaaa ttattaaaaa      840
taaaacttta aaaataattt cgtctaatta atattatgag ttaattcaaa cccacaggac      900
atgctaaggg ttaatcaaca atcatatcg tgtctcactc agactcaata cgacactcag      960
aatactattc ctttctactc cacttattgc aagcatacgt taagtggatg tctcttgccg     1020
acgggaccac cttatgttat ttcattcatg tctggccatt ctcatcgtga gcttccgggt     1080
gctcgcatat-ctggctctaa-gacttcgggc ccgacgcaag gagtagccga catatatccg     1140
aaataactgc ttgttttttt ttttaccatt attaccatcg tgtttactgt ttattgcccc     1200
ctcaaaaagc taatgtaatt atatttgtgc caataaaaac aagatatgac ctatagaata     1260
caagtatttc ccttcgaac atccccacaa gtagactttg gatttgtctt ctaacaaaaa     1320
gacttacaca cctgcatacc ttacatcaaa aactcgttta tcgctacata aaacaccggg     1380
atatattttt tatatacata cttttcaaat cgcgcgcctt cttcataatt cacctccacc     1440
acaccacgtt tcgtagttgc tctttcgctg tctcccacc gctctccgca acacattcac     1500
cttttgttcg acgacctgg agcgactgtc gttagttccg cgcgattcgg tgoggtattt     1560
cacaccgcat atggtgcact ctcatgacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc     1620
cccgacacc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg -     1680
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat     1740
caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca     1800
tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc     1860
ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct     1920

```

gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 1980
 cccttatccc ctttttttgcg gcatttttgc ttccgttttt tgctcaccca gaaacgctgg 2040
 tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 2100
 tcaacagcgg taagatccct gagagttttc gccccgaaga acgtttttcca atgatgagca 2160
 ctttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac 2220
 tcggtcgccc catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa 2280
 agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 2340
 ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 2400
 ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 2460
 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 2520
 gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 2580
 tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggct ggctggttta 2640
 ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg tatcattgca gcaactgggc 2700
 cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 2760
 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaaactgt 2820
 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 2880
 ggatctaggt gaagatccct tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 2940
 cgttccactg agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaagg atctctctga gatccttttt 3000
 ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt 3060
 tgccggatca-agagctacca actctttttc .cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 3120
 taccaaatac tgtccttcta gtgtagcgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 3180
 caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 3240
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 3300
 gctgaacggg ggggttcgtgc acacagccca gcttgaggcg aacgacctac accgaactga 3360
 gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3420
 ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gaggagctt ccagggggaa 3480
 acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttgcgccct ctgacttgag cgtcgatttt 3540
 tgtgatgtc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cttcttcttg aactcgggct 3600
 cgggtccagt atacctcaaa tggttgtcgt acctctcatg gtccggttac gccaacgagg 3660
 gtctgctgat taaccaatgg gcggacgtgg agcggggcga aattagctgc acatcgtcga 3720
 acaccacgtg cccagttcg ggcaagggtca tccctggagac gcttaacttc tccgcgcgcg 3780
 atctgccgct ggactacgtg ggtctggccc atgatgaaat aacataagggt ggtcccgtcg 3840
 aaagccgaag cttaccgaag tatacactta aattcagtc acgtttgctt gttgagagga 3900

aaggttggtg gcgacgaat ttttttttga aaacattaac ccttacgtgg aataaaaaaa 3960
aatgaaatat tgcaaatttt gctgcaaagc tgtgactgga gtaaaattaa ttcacgtgcc 4020
gaagtgtgct attagagaa aattgtggga gcagagcctt ggggtgcagcc ttggtgaaaa 4080
ctcccaaatt tgtgatccc actttaatga ttgcagtggt aaggctgcac ctgcaaaagg 4140
tcagacattt aaaaggaggc gactcaacgc agatgccgta cctagtaaag tgatagagcc 4200
tgaaccagaa aagataaaag aaggctatac cagtgggagt acacaaacag agtaagtttg 4260
aatagtaaaa aaaatcattt atgtaaacaa taacgtgact gtgcgttagg tcctgttcat 4320
tgtttaatga aaataagagc ttgagggaaa aaattcgtac tttggagtac gaaatgcgtc 4380
gttttagagca gcagccgaat taattctagt tccagtgaat tccaagcatt ttctaaatta 4440
aatgtattct tattattata gttgttattt ttgatataa taaacaacac tattatgccc 4500
accatttttt tgagatgcat ctacacaagg aacaaacact ggatgtcact ttcagttcaa 4560
attgtaacgc taatcactcc gaacaggtca caaaaaatta ccttaaaaag tcataatatt 4620
aaattagaat aaatatagct gtgagggaaa tatatacaaa tatattggag caaataaatt 4680
gtacatacaa atatttatta ctaatttcta ttgagacgaa atgaaccact cggaaccatt 4740
tgagcgaacc gaatcgcgcg gaactaacga cagtcgctcc aaggtcgtcg aacaaaaggt 4800
gaatgtgttg cggagagcgg gtgggagaca gcgaaagagc aactacgaaa cgtggtgtgg 4860
tgagggtgaa ttatgaagag ggcgcgcgat ttgaaaagta tgtatataaa aaatatatcc 4920
cgggtgtttt tgtagcgata aacgagtttt tgatgtaagg tatgcaggtg tgtaagtctt 4980
ttggttagaa gacaaatcca aagtctactt gtggggatgt tcgaagggga aatacttgta 5040
-ttctataggt_catatcttgt_ttttattggc .acaaatataa .ttacattagc tttttgaggg 5100
ggcaataaac agtaaacacg atggtaataa tggtaaaaaa aaaaaacaag cagttatttc 5160
ggatatatgt cggctactcc ttgcgtcggg cccgaagtct tagagccaga tatgcgagca 5220
cccggaagct cacgatgaga atggccagac ccacgtagtc cagcggcaga tcggcggcgg 5280
agaagttaag cgtctccagg atgacctgac ccgaactggg gcacgtggtg ttcgacgatg 5340
tgcagctaatt ttgcgccggc tccacgtccg ccatttggtt aatcagcaga cctcgttggt 5400
cgtaacggaa ccatgagagg tacgacaacc atttgaggta tactggcacc gagcccgagt 5460
tcaagaagaa gccgccaaag agcaggaatg gtatgataac cggcggaccc acagacagcg 5520
ccatcgaggt cgaggagctg gcgcaggata ttagatatcc gaaggacgtt gacacattgg 5580
ccaccagagt gaccagcgcc aggcagttga agaagtgcag cactccggcc cgcagtcoga 5640
tcacgggata ggcaatcgcc gtgaagacca gtggcactgt gagaaaaagc ggcaattcgg 5700
caatcgtttt gccagaaaag tatgtgtcac agcgataaag tcgacttcgg gcctccctca 5760
taaaaactgg cagctctgag gtgaacacct aaatcgaatc gattcattag aaagttagta 5820
aattattgaa atgcaaatgt attctaaaca tgacttacat ttatcgtggc aaagacgttt 5880

tgaaagggtca tgttggtcag gaagaggaag atgggtccgt tgatattcat cacaccact 5940
 tgcgtgagtt gttggcccaa aaagatgagg ccaatcaaga tggcaaccat ctgcaaatta 6000
 aaatgttact cgcattctcat taatatctgc gagttaaatg aaattttattt atcttctgca 6060
 aaactataaa ctatacatct cattgaaaaa aactaagaag ggtgtggaat caggcaattc 6120
 tatctaaaat cttagcgaatt tgtttccaag aattgtaagc gttatatcat ttgtttccac 6180
 tggaaaccact caccgttgtc tgaataagtc gcacttttac gaggagtggg tccctgagca 6240
 ccgacagcca ggatcgccac aggaccgccc ggaactgcat gaaccagggtg gccttgtagg 6300
 tgtaccatt ctccggctgc tccagtggct tctccagatt tttgggtggc aacaactget 6360
 ccatatcccg ggctactttg ctaatggcaa aattgtcgcc atatcttggc gatccgatca 6420
 cgggactcga tctcccgctc gggcacaacg gccaacacct gtacgtaaaa gtccgcccga 6480
 ttgtagttgg taggacactg ggcacccacg ctggatagga gttgagatgt aatgtaatgc 6540
 tagataccct taataaacac atcgaactca ctaggaaaag aagtcgacgg cttcgctggg 6600
 agtgcccaag aaagctacct tgccctcgcc catcagaagg atcttgtcaa agagctcaaa 6660
 cagctcggaa gacggctgat gaatggtcag gatgacggtc ttgcccttct gcgacagctt 6720
 cttcagcacc tggacgacgc tgtgggcggt aaatgagtc agtcggagg tgggctcatc 6780
 gcagatcaga agcggcggtat cggttagtgc ctccggaggc aatgccagac gcttccttct 6840
 tccgcggac agaccttca ccctgccggg cacaccgatg atcgtgtgct gacatttgc 6900
 gagcgaaagc tcctggatca cctgatccac gcgggccact cgctgccgat aggtcagatg 6960
 tcgtggcatc cgcaccatgg cttggaaaat caggtgttcc ctggccgtta gggagccgat 7020
 aaagagggtca .tcctgctgga cataggcgca .cctggcctgc .atctccttgg cgtccacagg 7080
 ttggccattg agcagtcgca tcccgatgg cgatacttgg atgccctgc gcgatcgaaa 7140
 ggcaagggca ttcagcaggg tcgtcttctc ggcaccggaa ctgcccatca cggccaaaag 7200
 ttcgcccga taggccacgc cgcaaaactga gtttcaaatt ggtaattgga ccctttatta 7260
 agatttcaca cagatcagcc gactgcgaat agaaactcac cgttcttgag caaatgtttc 7320
 ctgggcgcg gtatgtgtc ctctgtgcag aatagtcgc gtgtccggtt gaccagctgc 7380
 cgccatcccg agcccggtg attgaccgc ccaaagatgt ccatattgtg ccaggcatag 7440
 gtgaggttct cggctagtgt gccgctccct gaaccggagt cctccggcg actgggtggc 7500
 aggagcgtgc cgtagtttt ggccgtcccg aagccctggt taatgcagct ctgcgaagcg 7560
 tccgctgtca -ccctgeaatg -ataggggatc tcaaatatca actacaagcg ttatgctcat 7620
 ctaaccocga acaaaacgaa gtatcctacg aagtaggtt atacttttat ttattttttg 7680
 tgcatagctt aaaatatctg gttgttatat tttttgtaaa aaagaatgta gtcgaaaatg 7740
 aatgccttta gatgtcttga tcatgatatg atcttaaaaa ttgtcttata tagcgagcac 7800
 agctaccaga ataactgtt tcgtgtcact atttgtttgt gcgattgcgg tttgggattt 7860

ttgtgggtcg cagttctcac gccgcagaca atttgatggt gcaatgcag ttectataga	7920
tcaagtgaac ttaagatgta tgcacatgta ctactcacat tgttcagatg ctccggcagat	7980
gggtggttgc tgcctccgcg aattaatagc tcctgatcct cttggcccat tgccgggatt	8040
tttcacactt tcccctgctt acccacccaa aaccaatcac caccccaatc actcaaaaaa	8100
caaacaaaaa taagaagcga gaggagtttt ggcacagcac tttgtgttta attgatggcg	8160
taaaccgctt ggagcttcgt cagcaaaccg ctgacaaagt gcaactgaag gcggacattg	8220
acgctaggta acgctacaaa cgggtggcga agagatagcg gacgcagcgg cgaaagagac	8280
ggcgatatatt ctgtggacag agaaggaggc aaacagcgct gactttgagt ggaatgtcat	8340
tttgagtgag aggtaatcga aagaacctgg tacatcaaat acccttgat cgaagtaaat	8400
ttaaaactga tcagataagt tcaatgatat ccagtgcagt aaaaaaaaaa aatgtttttt	8460
ttatctactt tccgcaaaaa tgggtttttat taacttacat acatactaga attctaaaaa	8520
aaatcatgaa tggcatcaac tctgaatcaa atctttgcag atgcacctac ttctcatttc	8580
cactgtcaca tcatttttcc agatctcgct gcctgttatg tggcccacaa accaagacac	8640
gttttatggc cattaaagct ggctgatcgt cgccaaacac caaatacata tcaatatgta	8700
cattcgagaa agaagcgatc aaagaagcgt cttcggggca gtaggagaat gcggaggaga	8760
aggagaacga gctgatctag tatctctcca caatccaatg ccaactgacc aactggccat	8820
attcggagca atttgaagcc aatttccatc gcctggcgat cgctccatc ttggctatat	8880
gtttttcacc gttcccgggg ccattttcaa agactcgctg gtaagataag attgtgtcac	8940
tcgctgtctc tcttcatttg tcgaagaatg ctgaggaatt tcgcgatgac gtcggcgagt	9000
attttgaaga atgagaataa tttgtattta tacgaaaatc agttagtgga attttctaca	9060
aaaacatggt atctatagat aattttgttg caaaatatgt tgactatgac aaagattgta	9120
tgtatatacc tttaatgtat tctcattttc ttatgtattt ataatggcaa tgatgatact	9180
gatgatattt taagatgatg ccagaccaca ggctgatttc tgcgtctttt gccgaacgca	9240
gtgcatgtgc ggttgttgtt ttttggaaata gtttcaattt tcggactgtc cgctttgatt	9300
tcagtttctt ggcttattca aaaagcaaag taaagccaaa aaagcgagat ggcaatacca	9360
aatgcggcaa aacggtagtg gaaggaaagg ggtgcggggc agcggaaagga aggggtggggc	9420
ggggcggtgc ggggtctgtg gctgggcgcg acgtcaccga cgttggagcc actcctttga	9480
ccatgtgtgc gtgtgtgtat tattcgtgtc tcgccactcg ccggttgttt ttttcttttt	9540
atctcgctct ctctagcgcc atctcgtag catgctcaac gcaccgcatg ttgcggtgtc	9600
ctttatgcgt cattttggct cgaaataggc aattatttaa acaaagatta gtcaacgaaa	9660
acgctaaaaa aaataagtct acaatatggg tacttattgc catgtgtgtg cagccaacga	9720
tagcaacaaa agcaacaaca cagtggcttt ccctctttca ctttttgttt gcaagcgct	9780
gcgagcaaga cggcacgacc ggcaaacgca attacgctga caaagagcag acgaagtttt	9840

ggccgaaaaa catcaaggcg cctgatacga atgcatttgc aataacaatt gcgatattta 9900
 atattgttta tgaagctggt tgacttcaaa acacacaaaa aaaaaataa aacaaattat 9960
 ttgaaagaga attaggaatc ggacagctta tegtacggg ctaacagcac accgagacga 10020
 aatagcttac ctgacgtcac agcctctgga agaactgccg ccaagcagac gatgcagagg 10080
 acgacacata gagtagcgga gtaggccagc gtagtacga tgtgcttggt tgtgaggcgt 10140
 ctctctcttc gtctctgtt tgcgcaaacg catagactgc actgagaaaa tgcattacct 10200
 attttttatg aatgaatatt tgcactatta ctattcaaaa ctattaagat agcaatcaca 10260
 ttcaatagcc aaatactata ccacctgagc gatgcaacga aatgatcaat ttgagcaaaa 10320
 atgtgcata tttaggacgg catcattata gaaatgcttc ttgctgtgta cttttctctc 10380
 gtctggcagc tgtttcgccg ttattgttaa aaccggctta agttagggtg gtttctctacg 10440
 actagtgatg cccctactag aagatgtgtg ttgcacaaat gtccctgaat aaccaatttg 10500
 aagtgcagat agcagtaaac gtaagcta atgaatatta tttactgta atgtttta at 10560
 atcgtggac attactaata aaccactat aaacacatgt acatattgat gttttggcat 10620
 acaatgagta gttggggaaa aaatgtgtaa aagcaccgtg accatcacag cataaagata 10680
 accagctgaa gtatcgaata tgagtaaccc ccaaatgaa tcacatgccg caactgatag 10740
 gaccatgga agtacactct tcatggcgat atacaagaca cacacaagca cgaacaccca 10800
 gttgcgagg aaattctccg taaatgaaaa cccaatcggc gaacaattca taccatata 10860
 tggtaaaagt tttgaacggc acttgagagc ggagagcatt gcggctgata aggttttagc 10920
 gctaagcggg ctttataaaa cgggctgcgg gaccagtttt catatcacta ccgtttgagt 10980
 -tcttgtgctg -tctggatact -cctcccgaca -caaagccgct ccatcagcca gcagtcgtct 11040
 aatccagaga ccccgatct agaaccaaaa tggctagatt agataaaagt aaagtgatta 11100
 acagcgcat agagctgctt aatgaggtcg gaatcgaagg tttaacaacc cgtaaaactcg 11160
 ccagaagct aggtgtagag cagcctacat tgtattggca tgtaaaaaat aagcgggctt 11220
 tgctcgacgc cttagccatt gagatgttag ataggcacca tactcacttt tgccctttag 11280
 aaggggaaaag ctggcaagat tttttacgta ataacgctaa aagttttaga tgtgctttac 11340
 taagtcacgc cgatggagca aaagtacatt taggtacacg gcctacagaa aaacagtatg 11400
 aaactctcga aaatcaatta gcctttttat gccaaacagg tttttcacta gagaatgcat 11460
 tatatgcact cagcgtgtg gggcatttta ctttaggttg cgtattggaa gatcaagagc 11520
 atcaagtcgc taaagaagaa agggaaacac ctactactga tagtatgccg ccattattac 11580
 gacaagctat cgaattattt gatcaaccaag gtgcagagcc agccttctta ttccggccttg 11640
 aattgatcat atgcggatta gaaaaacaac ttaaagtga aagtgggtcc gcgtacagcc 11700
 gcgcggtac gaaaaacaat tacgggtota ccacgaggg cctgctcgat ctcccgagc 11760
 acgacgcccc cgaagaggcg gggctggcgg ctccgcgcct gtctttctc cccgcgggac 11820

ES 2 447 422 T3

acacgcgcag actgtcgacg gcccccccgga cegatgtcag cctggggggac gagctccact 11880
tagacggcga ggacgtggcg atggcgcatg ccgacgcgct agacgatttc gatctggaca 11940
tgttggggga cggggattcc ccgggtccgg gatttacccc ccacgactcc gccccctacg 12000
gcgctctgga tatggccgac ttcgagtttg agcagatggt taccgatgcc cttggaattg 12060
acgagtacgg tgggtagggg gcgcgag 12087

<210> 16
<211> 11920
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> pLA513

<400> 16

gggcgatct gacaatgttc agtgcagaga ctcggtacg cctcgtggac tttgaagttg 60
accaacaatg tttattctta cctctaatag tcctctgtgg caaggccaag attctgttag 120
aagccaatga agaacctggg tgttcaataa cattttgttc gtctaataat tcaactaccg 180
ttgacgttgg ctgcacttca tgtacctcat ctataaacgc ttcttctgta tcgctctgga 240
cgtcatcttc acttacgtga tctgatattt cactgtcaga atcctcacca acaagctcgt 300
catcgctttg cagaagagca gagaggatat gctcatcgtc taaagaacta cccattttat 360
tatatattag tcacgatatc tataacaaga aatatatat ataataagtt atcacgtaag 420
tagaacatga aataacaata taattatcgt atgagttaaa tcttaaaagt cacgtaaaag 480
ataatcatgc gtcattttga ctacgcggg cgttatagtt caaaatcagt gacacttacc 540
gcattgacaa_gcacgcctca_cgggagctcc aagcggcgac tgagatgtcc taaatgcaca 600
gcgacggatt cgcgctatct agaaagagag agcaatattt caagaatgca tgcgtcaatt 660
ttaacgcagac tatctttcta ggggtaaaaa agatttgccg tttactcgac ctaaaacttta 720
aacacgtcat agaatcttcg tttgacaaaa accacattgt ggccaagctg tgtgacgcga 780
cgcgcgctaa agaatggcaa accaagtcgc gcgagcgtcg acctgcaggc atgcaagctt 840
gcatgcctgc aggtcgaaat tcgtaatcat ggcatagct gtttcctgtg tgaaattggt 900
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg 960
cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg 1020
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc 1080
gtattggggc ctcttcgct tcctcgctca ctgactcgct gcgcteggtc gttcggtgct 1140
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 1200
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaaccg aaaaaggccg 1260
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1320
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa 1380

gctccctcgt gcgtctcct gttccgaccc tgcggttac cggatacctg tccgcctttc 1440
 tcccttcggg aagcgtggcg cttctcctaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 1500
 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1560
 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcga acccggttaag acacgactta tcgccactgg 1620
 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgagggtatgt aggcgggtgct acagagttct 1680
 tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgtctgct 1740
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1800
 ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1860
 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt 1920
 aagggtttt ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa 1980
 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttgggtctgac agttaccaat 2040
 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct 2100
 gactcccggt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc ccagtgctg 2160
 caatgatacc gcgagacca cgctcacgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2220
 ccggaagggc cgagcgaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2280
 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg 2340
 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2400
 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 2460
 ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca ctcatggtta 2520
 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2580
 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2640
 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 2700
 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 2760
 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2820
 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaagg aataaggcg acacggaaat 2880
 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag gggtattgtc 2940
 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 3000
 catttccccg aaaagtcca cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg acattaacct 3060
 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtctcgccg tttcgggtgat gacgggtgaa 3120
 acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga 3180
 gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc tggcttaact 3240
 atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca 3300
 gatgcgtaag gagaaaatac cgcacaggg gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt 3360

ggggaagggcg atcgggtgagg gcctcttcgc tattacgccg gctggcgaaa gggggatgtg 3420
 ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag gggtttccca gtcacgacgt tgtaaacga 3480
 cggccagtgc caagctttgt ttaaaatata acaaaattgt gatcccacaa aatgaagtgg 3540
 ggcaaaatca aataattaat agtgtcgta aacttggtgg tcttcaactt tttgaggaac 3600
 acgttgagcg gcaaattcgt gactataaca caagttgatt taataatatt agccaacacg 3660
 tcgggctgag tgttttttgc cgacggctct gtgtacacgt tgattaactg gtcgattaaa 3720
 ctggtgaaat aatttaattt ttggttcttc tttaaatctg tgatgaaatt ttttaaaata 3780
 actttaaat cttcattggg aaaaaatgcc acgttttgca acttgtaggg gtctaataatg 3840
 aggtcaaaact cagtaggagt tttatccaaa aaagaaaaca tgattacgtc tgtacacgaa 3900
 cgggtattaa cgcagagtgc aaagtataag aggggtaaaa aatatatttt acgcaccata 3960
 tacgcatcgg gttgatatcg ttaatatgga tcaatttgaa cagttgatta acgtgtctct 4020
 gctcaagtct ttgatcaaaa cgcaaatcga cgaaaatgtg tcggacaata tcaagtcgat 4080
 gagcgaaaaa ctaaaaaggc tagaatacga caatctcaca gacagcggtg agatatacgg 4140
 tattcacgac agcaggctga ataataaaaa aattagaaac tattatttaa ccctagaaag 4200
 ataatcatat tgtgacgtac gttaaagata atcatgcgta aaattgacgc atgtgtttta 4260
 tcggctctga tatcgagggt tattttattaa tttgaataga tattaagttt tattatattt 4320
 acacttacat actaataata aattcaacaa acaatttatt tatgtttatt tattttattaa 4380
 aaaaaaacaa aaactcaaaa tttcttctat aaagtaacaa aacttttaaa cattctctct 4440
 tttacaaaaa taaacttatt ttgtacttta aaaacagtca tgttgattta taaaataagt 4500
 -aattagctta-acttatacat..aatagaaaca_aattataactt attagtcagt cagaaacaac 4560
 tttggcacat atcaatatta tgctctcgac aaataacttt tttgcatttt ttgcacgatg 4620
 catttgcttt tcgctttatt ttagaggggc agtaagtaca gtaagtacgt tttttcatta 4680
 ctggctcttc agtactgtca tctgatgtac caggcacttc atttggaaca atattagaga 4740
 tattatcgcg caaatatctc ttcaaagtag gagcttctaa acgcttacgc ataaacgatg 4800
 acgtcaggct catgtaaagg tttctcataa attttttgcg actttggacc tttctctcct 4860
 tgctactgac attatggctg tatataataa aagaatttat gcaggcaatg tttatcattc 4920
 cgtacaataa tgccataggc cacctattcg tcttctact gcaggctcgc acagaacaca 4980
 tttggcttag cgtgtccact ccgcctttag tttgattata atacataacc atttgcggtt 5040
 taccggtact ttcgttgata gaagcatcct catcacaaga tgataataag tataccatct 5100
 tagctggctt cgggtttatat gagacgagag taaggggtcc gtcaaaacaa aacatcgatg 5160
 ttccactgg cctggagcga ctgtttttca gtacttcggg tatctcgctt ttgtttgatc 5220
 gcaagggtcc cacaatgggt gcggccggcc agatttaaat gagcgccgc agatatccag 5280
 tgcagtaaaa aaaaaaatg ttttttttat ctactttccg caaaaatggg ttttattaac 5340

ttacatacat actagaattc tatattctaa aaacacaaat gatacttcta aaaaaaatca 5400
 tgaatggcat caactctgaa tcaaatcttt gcagatgcac ctacttctca tttccactgt 5460
 cacatcattt ttccagatct cgctgcctgt tatgtggccc acaaaccaag acacgtttta 5520
 tggccattaa agctggctga tcgtcgccaa acaccaata catatcaata tgtacattcg 5580
 agaaagaagc gatcaaagaa gcgtcttcgg gcgagtagga gaatgcggag gagaaggaga 5640
 acgagctgat ctagtatctc tccacaatcc aatgccaaact gaccaactgg ccatattcgg 5700
 agcaatttga agccaatttc catcgctcgg cgatcgctcc attcttggct atatgttttt 5760
 caccgttccc gggggcattt tcaaagactc gtcggtaaga taagattgtg tcactcgctg 5820
 tctctcttca tttgtcgaag aatgctgagg aatttcgcga tgacgtcggc gagtattttg 5880
 aagaatgaga ataatttga tttatacgaa aatcagttag tgggaattttc taaaaaaca 5940
 tgttatctat agataatttt gttgcaaat atgttgacta tgacaaagat tgtatgtata 6000
 tacctttaat gtattctcat tttcttatgt atttataatg gcaatgatga tactgatgat 6060
 attttaagat gatgccagac cacaggctga tttctgcgtc ttttgccgaa cgcagtgcac 6120
 gtgcggttgt tgttttttgg aatagtttca attttcggac tgtccgcttt gatttcagtt 6180
 tcttggttta ttcaaaaagc aaagtaaagc caaaaaagcg agatggcaat accaaatgcg 6240
 gcaaaacggt agtggaagga aaggggtgcg gggcagcggg aggaaggggtg gggcggggcg 6300
 tggcgggggc tgtggctggg cgcgacgtca ccgacgttgg agccactcct ttgaccatgt 6360
 gtgcgttgtt gtattattcg tgtctcgcca ctgcgggtt gtttttttct ttttatctcg 6420
 ctctctctag cgccatctcg tacgcatgct caacgcaccg catgttgccg tgtcctttat 6480
 gcgtcatttt ggctcgaaat aggcattat ttaaacaag attagtcaac gaaaacgcta 6540
 aaataaataa gtctacaata tggttactta ttgccatgtg tgtgcagcca acgatagcaa 6600
 caaaagcaac aacacagtgg ctttcctctt ttcacttttt gtttgcaagc gcgtgcgagc 6660
 aagacggcac gaccggcaaa cgcaattacg ctgacaaaga gcagacgaag ttttggccga 6720
 aaaacatcaa ggcgctgat acgaatgcat ttgcaataac aattgcgata tttaatattg 6780
 tttatgaagc tgtttgactt caaaacacac aaaaaaaaa ataaaacaaa ttatttgaaa 6840
 gagaattagg aatcggacag ottatcgta cgggctaaca gcacaccgag acgaaatagc 6900
 ttacctgacg tcacagctc tggagaact gccgccagc agacgatgca gaggaagaca 6960
 catagagtag cggagtaggc cagcgtagta cgcattgtgt tgtgtgtgag gcgtctctct 7020
 cttcgtctcc tgtttgcgca aacgcataga ctgcactgag aaaatcgatt acctattttt 7080
 tatgaatgaa tatttgact attactattc aaaactatta agatagcaat cacattcaat 7140
 agccaaatac tataccacct gagcgatgca acgaaatgat caatttgagc aaaaatgctg 7200
 catatttagg acggcatcat tatagaaatg cttcttgctg tgtacttttc tctcgtctgg 7260
 cagctgtttc gccgttattg ttaaaaccgg ctttaagttag gtgtgttttc taogactagt 7320

gatgcccta ctagaagatg tgtgttgac aaatgtccct gaataaccaa tttgaagtgc 7380
agatagcagt aaacgtaagc taatatgaat attatttaac tgtaatgttt taatatcgct 7440
ggacattact aataaaccca ctataaacac atgtacatat gtatgttttg gcatacaatg 7500
agtagttggg gaaaaaatgt gtaaaagcac cgtgaccatc acagcataaa gataaccagc 7560
tgaagtatcg aatatgagta acccccaaat tgaatcacat gccgcaactg ataggaccca 7620
tggaagtaca ctcttcatgg cgatatacaa gacacacaca agcacgaaca ccagttgcg 7680
gaggaaattc tccgtaaatg aaaacccaat cggcgaacaa ttcataccca tatatggtaa 7740
aagttttgaa cgcgacttga gagcggagag cattgcggct gataaggttt tagcgcctaag 7800
cgggctttat aaaacgggct gcgggaccag ttttcatatc actaccgttt gagttcttgt 7860
gctgtgtgga tactcctccc gacacaaagc cgctccatca gccagcagtc gtctaacca 7920
gagaccccg atctagaacc aaaatggcta gaatggctc ctccgagaac gtcacaccg 7980
agttcatgag cttcaagggt cgcattggag gccacgtgaa cggccacgag ttcgagatcg 8040
agggcgaggg cgagggccgc cctacgagg gccacaacac cgtgaagctg aaggtagcca 8100
agggcgggcc cctgcccttc gcctgggaca tctgtcccc ccagttccag tacggctcca 8160
aggtgtacgt gaagcaccgc gccgacatcc ccgactacaa gaagctgtcc tccccgagg 8220
gcttcaagtg ggagcgcgtg atgaacttcg aggacggcgg cgtggcgacc gtgaccagg 8280
actcctccct gcaggacggc tgcttcatct acaaggtgaa gttcatcggc gtgaacttec 8340
cctccgacgg ccccgtagt cagaagaaga ccatgggctg ggaggcctcc accgagcgcc 8400
tgtaccccg cgacggcgtg ctgaaggcg agaccacaa ggccctgaag ctgaaggacg 8460
gcggccacta cctggtggag tccaagtcca tctacatggc caagaagccc gtgcagctgc 8520
cgggtacta ctacgtggac gccaaagtgg acatcacctc ccacaacgag gactacacca 8580
tcgtggagca gtacgagcgc accgagggcc gccaccacct gttcctgtga gatccatgag 8640
caattagcat gaacgttctg aaaagcgcgt ttagctctcc actacttaca catattctat 8700
gctgcaatat tgaaaatcta ataaacaaaa ctaatgtaca ttaattcttc agttttgaat 8760
atccttctcc tgactttctt atttagaatt aatataatac tgcatacatt aatactgtaa 8820
atatgataag tacctgcaaa aactgcagc tcaagtctta atgaggttct gogatagctt 8880
agcataatta gtaacttata gcgcagaatt ccctaattgt cccgacctac atgtacttct 8940
gatagttgcc gaggtcaaat gttgtgtat ttgtattata cctcaatatt ggtatattca 9000
atatctaata gtacccaatt caattgcaaa gatagtcatt aaaaaaacct aaatcacttg 9060
caaattgact tttctgccgg aaaagcaacc ttgacacaca aagttaatta gtttatctgg 9120
aagtcagtgt agaaatttgt aaataaaatt tttcgagta atttaagtgg gcctaattcc 9180
ttttaagcat cttggtttta cgatgacacc gcaataaggt acaactttat attgtttttg 9240
caatcagctt gagtctttat taggcacag tctttctctc taagtttctt cgtgcaataa 9300

atgaggttcc aaactccgta gatttttccct tctttgttga atccagatcc tgcaaagaaa	9360
aaagagcaaaa cccctaggtc tgtccaggaa tgtattttcg tgtttgtcga tgcaccatgg	9420
tctcgagggg gggccttaat taagaggcgc gccaggtttc gactttcact tttctctatc	9480
actgataggg agtggtaaac tcgactttca cttttctcta tcactgatag ggagtggtaa	9540
actcgacttt cacttttctc tatcactgat agggagtggg aaactcgact ttcacttttc	9600
tctatcactg atagggagtg gtaaactcga ctttcacttt tctctatcac tgatagggag	9660
tggtaaactc gactttcact tttctctatc actgataggg agtggtaaac tcgactttca	9720
cttttctcta tcactgatag ggagtggtaa actcgaaaac gagcgccgga gtataaatag	9780
aggcgcttcg tctacggagc gacaattcaa ttcaaacaag caaagtgaac acgtcgctaa	9840
gcgaaagcta agcaataaaa caagcgcagc tgaacaagct aaacaatctg cggtaacctg	9900
gcggtaagtt gatcaaagga aacgcaaagt tttcaagaaa aaacaaaact aatttgattt	9960
ataacacctt tagaaaccac catgggcagc cgctggata agtccaaagt catcaactcc	10020
gcgttgagc tgttgaacga agttggcatt gagggactga cgacccgcaa gttggcgag	10080
aagctgggagc tggagcagcc caccctctac tggcacgtga agaataagcg ggcgctgctg	10140
gatgccttg ccactcgagat gctcgaccgc caccacacgc atttttgccc gttggaaggc	10200
gagtcctggc aggacttcc cgcgaataac gccaaagtcg tccgctgcgc tctgctgtcc	10260
caccgagacg gtgcaaaagt ccactctggc acgcgcccga cggaaaagca atacgagaca	10320
ctggagaacc agctcgcggt cctgtgccag caaggcttca gcctggaaaa tgcctctctac	10380
gctctgagcg ccgtcggtca ctttaccctg ggctgcgtgc tggaggacca agagcatcaa	10440
gtcgcaaaag aggagcgcga gacccaaca accgattcga tgccccact gctgcgtcag	10500
gcaatcgagc tgttcgatca tcaaggagcc gagccggcat tcctgttcgg cttggagctg	10560
attatctgcg gattggaaaa gcaactgaaa tgcgagtcgg gctcggggcc cgcgtaacgc	10620
cgcgcgcgta cgaaaaacaa ttacgggtct accatcgagg gcctgctcga tctcccgac	10680
gacgagccc ccgaagaggc ggggctggcg gctccgcgcc tgcctttct ccccgcgga	10740
cacacgcgca gactgtcgac gggccccccg accgatgtca gcctggggga cgagctccac	10800
ttagacggcg aggacgtggc gatggcgcat gccgacgcgc tagacgattt cgatctggac	10860
atggtggggg acggggatcc ccgggtccg ggatttacc cccacgactc cgccccctac	10920
ggcgctctgg atatggccga cttcgagttt gagcagatgt ttaccgatgc ccttggaatt	10980
gacgagtacg gtgggtagtt ctagagtcga cctcgaaegt taacgttaac gtaacgttaa	11040
ctcgaggagc ttgataacat tatacctaaa cccatggtca agagtaaaca tttctgcctt	11100
tgaagttgag aacacaatta agcatccctt ggttaaacct gacattcata cttgttaata	11160
gcgccataaa catagcacca atttcgaaga aatcagttaa aagcaattag caattagcaa	11220
ttagcaataa ctctgctgac ttcaaaacga gaagagttgc aagtatttgt aaggcacagt	11280

ttatagacca ccgacggctc attagggctc gtcattgtaac taagcgcggg gaaacccaat 11340
 tgaacatata gtggaattat tattatcaat ggggaagatt taaccctcag gtagcaaagt 11400
 aatttaattg caaatagaga gtcctaagac taaataatat atttaaaaat ctggcccttt 11460
 gaccttgctt gtcagggtgca tttgggttca atcgtaagtt gcttctatat aaacactttc 11520
 cccatccccg caataatgaa gaataccgca gaataaagag agatttgcaa caaaaaataa 11580
 aggcattgctg aaaacttttt atgggggatc attacactcg ggcttacggg tacaattccc 11640
 agccacttaa ggcacaagtt tggccaacaa tccatctaag agctaataag gcaatcactg 11700
 gtaatcgcaa gagtatatag gcaatagaac ccatggattt gaccaaaggt aaccgagaca 11760
 atggagaagc aagaggattt caaactgaac acccacagta ctgtgtacta ccactggcgc 11820
 gtttgggagc tccaagcggc gactgagatg tcctaaatgc acagcgacgg attcgcgcta 11880
 tttagaaaga gagagcaata tttcaagaaa aacggcgccc 11920

<210> 17
 <211> 11570
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA517

<400> 17

ggcgcgtcat ttaaattctgg ccggccgcaa ccattgtggg aaccgtgcga tcaaacaac 60
 gcgagatacc ggaagtactg aaaaacagtc gctccaggcc agtgggaaca tcgatgtttt 120
 gttttgaagg accccttact ctgcgtctcat ataaaccgaa gccagctaag atgggtatact 180
 .tattatcatc .ttgtgatgag .gatgcttcta .tcaacgaaag .tacgggtaaa ccgcaaatgg 240
 ttatgtatta taatcaaaact aaaggcggag tggacacgct agaccaaagtg tgttctgtga 300
 tgacctgcag taggaagacg aataggtggc ctatggcatt attgtacgga atgataaaca 360
 ttgcctgcat aaattctttt attatataca gccataatgt cagtagcaag ggagaaaagg 420
 tccaaagtcg caaaaaattt atgagaaacc tttacatgag cctgacgtca tcgtttatgc 480
 gtaagcggtt agaagctcct actttgaaga gatatttgcg cgataatatc tctaataattt 540
 tgccaaatga agtgccctgg acatcagatg acagtactga agagccagta atgaaaaaac 600
 gtacttactg tacttactgc ccctctaaaa taaggcgaaa ggcaaatgca tcgtgcaaaa 660
 aatgcaaaaa agttatttgt cgagagcata atattgatat gtgccaaagt tgtttctgac 720
 tgactaataa gtataatttg .tttctattat gtataagtta agctaattac ttattttata 780
 atacaacatg actgttttta aagtacaaaa taagtttatt tttgtaaaag agagaatggt 840
 taaaagtttt gttactttat agaagaaatt ttgagttttt gttttttttt aataaataaa 900
 taaacataaa taaattgttt gttgaattta ttattagtat gtaagtgtaa atataataaa 960
 acttaatatc tattcaaat aataaataaa cctcgatata cagaccgata aaacacatgc 1020

gtcaatttta cgcattgatta tctttaacgt acgtcacaa atgattatct ttctagggtt 1080
 aaataatagt ttctaatttt ttattatttc agcctgctgt cgtgaatacc gtatatctca 1140
 acgctgtctg tgagattgtc gtattctagc ctttttagtt ttctgctcat cgacttgata 1200
 ttgtccgaca cattttcgtc gattttgcgtt ttgatcaaag acttgagcag agacacgtta 1260
 atcaactgtt caaattgac catattaacg atatcaacce gatgcgtata tgggtgcgtaa 1320
 aatatatttt ttaacctctt tatactttgc actctgcgtt aatacgcgtt cgtgtacaga 1380
 cgtaatcatg ttttcttttt tggataaaaac tctactgag tttagacctca tattagacct 1440
 tcacaagttg caaaacgtgg cattttttac caatgaagaa tttaaagtta ttttaaaaaa 1500
 tttcatcaca gatttaaaga agaaccaaaa attaaattat ttcaacagtt taatcgacca 1560
 gttaatcaac gtgtacacag acgcgtcggc aaaaaacacg cagcccgacg tgttggttaa 1620
 aattattaaa tcaacttgtg ttatagtcac ggatttgccg tccaacgtgt tctcaaaaaa 1680
 gttgaagacc aacaagttta cggacactat taattatttg attttgcccc acttcatttt 1740
 gtgggatcac aattttgtta tattttaaac aaagcttggc actggccgctc gttttacaac 1800
 gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgacgca catccccctt 1860
 tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 1920
 gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgggtt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt 1980
 cacaccgcat atggtgcact ctcatgacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc 2040
 cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg 2100
 cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat 2160
 _caccgaaacg_cgcgagacga .aagggcctcg tgatacgccct atttttatag gttaatgtca 2220
 tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc 2280
 ctatttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataacctt 2340
 gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 2400
 cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgcctaccca gaaacgotgg 2460
 tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 2520
 tcaacagcgg taagatcctt gagagtttcc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca 2580
 cttttaaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatccgctat tgacgcggg caagagcaac 2640
 tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa 2700
 _agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgcata accatgagtg 2760
 ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 2820
 ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 2880
 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 2940
 gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 3000

tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggct ggctggttta 3060
 ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg ·tatcattgca gcaactgggc 3120
 cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 3180
 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 3240
 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 3300
 ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 3360
 cgttcactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 3420
 ttctgcgct aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt 3480
 tgcgggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 3540
 taccaaatac tgtccttcta gtgtagcgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 3600
 caccgcctac atacctcgct ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 3660
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 3720
 gctgaacggg gggttcgtgc acacagcca gcttgagcg aacgacctac accgaactga 3780
 gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3840
 ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa 3900
 acgctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 3960
 tgtgatgtc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 4020
 ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcttga tccctgatt 4080
 ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 4140
 .ccgagcgag_cgagtcagtg_agcgaggaag_cggaagagcg cccaatacgc aaacgcctc 4200
 tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag 4260
 cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggctt 4320
 tacactttat gcttcgggt cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 4380
 caggaaacag ctatgacat gattaagaat ttcgacctgc aggcattgcaa gcttgcattg 4440
 ctgcaggtcg acgctcgccg gacttggttt gccattcttt agcgcgcgtc gcgtcacaca 4500
 gcttgccac aatgtggttt ttgtcaaacg aagattctat gacgtgttta aagtttaggt 4560
 cgagtaaagc gcaaactctt tttaaccta gaaagatagt ctgcgtaaaa ttgacgcatg 4620
 cattcttgaa atattgctct ctctttctaa atagcgcaa tccgtcgctg tgcatttagg 4680
 acatctcagt cgcgcttg agctcccggt aggcgtgctt gtcaatgctg taagtgtcac 4740
 tgattttgaa ctataacgac cgcgtgagtc aaaatgacgc atgattatct ttacgtgac 4800
 ttttaagatt taactcatac gataattata ttgttatttc atgttctact tacgtgataa 4860
 cttattatat atatattttc ttgttataga tatcgtgact aatatataat aaaatgggta 4920
 gttctttaga cgatgagcat atctctctg ctcttctgca aagcgatgac gagcttggtg 4980

gtgaggattc tgacagtga atatcagatc acgtaagtga agatgacgtc cagagcgata 5040
 cagaagaagc gtttatagat gaggtacatg aagtgcagcc aacgtcaagc ggtagtgaaa 5100
 tattagacga acaaaatggt attgaacaac cagggtcttc attggcttct aacagaatct 5160
 tgaccttgcc acagaggact attagaggta agaataaaca ttgttgggtca acttcaaagt 5220
 ccacgaggcg tagccgagtc tctgcaactga acattgtcag atcggcccg ggcgcgttcc 5280
 ccaaacgcgc cagtggtagt acacagtact gtgggtgttc agtttgaaat cctcttgctt 5340
 ctccattgtc tcggttacct ttggtcaaat ccatgggttc tattgcttat atactcttgc 5400
 gattaccagt gattgcgcta ttagctatta gatggattgt tggccaaact tgtcgcttaa 5460
 gtggctggga attgtaaccg taggcccag tgtaatgac cccataaaa agttttcgca 5520
 atgcctttat tttttgttgc aaatctctct ttattctgcg gtattcttca ttattgcggg 5580
 gatggggaaa gtgtttatat agaagcaact tacgattgaa cccaaatgca cctgacaagc 5640
 aagggtcaaag ggccagattt ttaaataatat tatttagtct taggactctc tatttgcaat 5700
 taaattactt tgctacctga gggttaaatc ttcccattg ataataataa ttccactata 5760
 tgttcaattg ggtttcaccg cgcttagtta catgacgagc cctaattgagc cgtcggtggt 5820
 ctataaactg tgccttacia atacttgcaa ctcttctcgt tttgaagtca gcagagttat 5880
 tgctaattgc taattgctaa ttgcttttaa ctgatttctt cgaaattggg gctatgttta 5940
 tggcgtatt aacaagtatg aatgtcaggt ttaaccaggg gatgcttaat tgtgttctca 6000
 acttcaaagg cagaaatggt tactcttgac catgggttta ggtataatgt tatcaagctc 6060
 ctogagttaa cgttacgta acgttaacgt togaggtcga ctctagatta ttacagcatg 6120
 tcgagatcaa agtcgtccaa agcatcagcg ggcaacatat ccaagtcaa atcatcgaga 6180
 gcgtccgcg gcagcatatc caggtcgaag tcattccagg catcggcggg gcccgagccc 6240
 gactcgatt tcagttgctt ttccaatccg cagataatca gctccaagcc gaacaggaat 6300
 gccggctcgg ctcttgatg atcgacagc tcgattgcct gacgcagcag tgggggcac 6360
 gaatcggttg ttgggtctc gcgtctctt tttgcgactt gatgctcttg gtctccagc 6420
 acgcagccca gggtaaagt accgacggcg ctccagagct agagagcatt ttccaggctg 6480
 aagccttgct ggcacaggaa cgcgagctgg ttctccagt tctogtattg cttttcggtc 6540
 gggcgctgc cgagatggac tttggcaccg tctcgggtgg acagcagagc gcagcggaac 6600
 gacttggcgt tattgcggag gaagtcctgc caggactcgc cttccaacgg gcaaaaatgc 6660
 gtgtgggtgg ggtcgagcat ctcgatggcc agggcatcca gcagcggccg cttattcttc 6720
 acgtgccagt agaggggtgg ctgctccacg cccagcttct gcgccaactt ggggtcgtc 6780
 agtccctcaa tgccaacttc gttcaacagc tccaacggg agttgatgac tttggactta 6840
 tccaggcggc tgcccatggg ggtttctaaa ggtgttataa atcaaattag ttttgtttt 6900
 tcttgaaaac tttgcgttcc ctttgatcaa cttaccgcca gggtaacgca gattgtttag 6960

cttgttcage tgcgcttggt tatttgctta gctttcgctt agcgacgtgt tcactttgct 7020
 tgtttgaatt gaattgtcgc tccgtagacg aagcgctctt atttatactc cggcgctcgt 7080
 ttctgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc 7140
 ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa 7200
 agtgaaagtc gagtttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagtttac 7260
 cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata 7320
 gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga 7380
 aacctggcgc gcctcttaat taaggccccc cctcgagacc atggctcgatc gacaaacacg 7440
 aaaatacatt cctggacaga cctaggggtt tgctcttttt tctttgcagg atctggattc 7500
 aacaaagaag gaaaaatcta cggagtttgg aacctcattt attgcacgaa gaaacttaga 7560
 gagaaagact gatgcctaataa aaagactcaa gctgattgca aaaacaatat aaagttgtac 7620
 cttattgcgg tgcatcgta aaaccaagat gcttaaaagg gattaggccc acttaaatga 7680
 ctgcgaaaaa ttttatttac aaatttctca catgacttcc agataaacta attaaccttg 7740
 tgtgtcaagg ttgcttttcc ggcagaaaag tcaatttgca agtgatttag gtttttttaa 7800
 tgactatctt tgcaattgaa ttgggtacta ttagatattg aatataccaa tattgaggtg 7860
 taatacaaat acaacaacat ttgacctcgg caactatcag aagtacatgt aggtcgggaa 7920
 cattagggaa ttctgcgcga taagttacta attatgctaa gctatcgcag aacctcatta 7980
 agacttgagc tgcagtggtt tgcaggtact tatcatattt acagtattaa tgtatgcagt 8040
 attatattaa ttctaaataa gaaagtcagg agaaggatat tcaaaactga agaattaatg 8100
 tacattagtt ttgtttatta gatcttcaat atggcagcat agaatatgtg taagtagtgg 8160
 agagctaaac gcgcttttca gaacgttcat gctaattgct catggatctc acaggaacag 8220
 gtggtggcgg ccctcgggtc gctcgtactg ctccacgatg gtgtagtcct cgttggtgga 8280
 ggtgatgtcc agcttggcgt ccacgtagta gtagccgggc agctgcacgg gcttcttggc 8340
 catgtagatg gacttgaact ccaccaggta gtggccgcgg tccttcagct tcagggcctt 8400
 gtgggtctcg cccttcagca cgcgctcgg gggttacagg cgtcgggtgg aggcctccca 8460
 gcccatggtc ttcttctgca tcacggggcc gtcggagggg aagttcacgc cgatgaactt 8520
 cacttcttag atgaagcagc cgtcctgcag ggaggagtcc tgggtcacgg tcgccacgcc 8580
 gccgtcctcg aagttcatca cgcgctccca cttgaagccc tcggggaagg acagcttctt 8640
 gtagtcgggg atgtcggcgg ggtgcttcac gtacaccttg gagccgtact ggaactgggg 8700
 ggacaggatg tcccaggcga agggcagggg gccgcccttg gtcaccttca gtttcacggt 8760
 gttgtggccc tcgtaggggc ggccctcgcc ctgcacctcg atctcgaact cgtggccggt 8820
 cacggtgccc tccatgcgca ccttgaagcg catgaactcg gtgatgacgt tctcggagga 8880
 ggccattcta gccattttgg ttctagatcc ggggtctctg gattagacga ctgctggctg 8940

atggagcggc tttgtgtcgg gaggagtatc cacacagcac aagaactcaa acggtagtga 9000
 tatgaaaact ggtcccgcag cccgttttat aaagcccgct tagcgctaaa accttatcag 9060
 ccgcaatgct ctccgctctc aagtcgcggt caaaactttt accatatatg ggtatgaatt 9120
 gttcgccgat tgggttttca tttacggaga atttccctcg caactgggtg ttcggtgcttg 9180
 tgtgtgtctt gtatatcgcc atgaagagtg tacttccatg ggtcctatca gttgcggcat 9240
 gtgattcaat ttgggggtta ctcatattcg atacttcagc tggttatctt tatgctgtga 9300
 tggtaacggg gctttttacac attttttccc caactactca ttgtatgcca aaacatacat 9360
 atgtacatgt gtttatagtg ggtttattag taatgtccag cgatattaaa acattacagt 9420
 taaataatat tcatattagc ttacgtttac tgctatctgc acttcaaatt ggttattcag 9480
 ggacatttgt gcaacacaca tcttctagta ggggcacac tagtcgtaga aaacacacct 9540
 aacttaagcc ggttttaaca ataacggcga aacagctgcc agacgagaga aaagtacaca 9600
 gcaagaagca tttctataat gatgccgtcc taaatatgca gcatttttgc tcaaattgat 9660
 catttcggtg catcgctcag gtggtatagt atttggtat tgaatgtgat tgctatctta 9720
 atagttttga atagtaatag tgcaaatatt cattcataaa aaataggtaa tcgattttct 9780
 cagtgcagtc tatgcgtttg cgcaaacagg agacgaagag agagacgcct cacacacaag 9840
 cacatgcgta ctacgctggc ctactccgct actctatgtg tcgtcctctg catcgctctg 9900
 ttggcggcag ttcttccaga ggtgtgacg tcaggtaagc tatttcgtct cgggtgtgctg 9960
 ttagcccgta acgataagct gtccgattcc taattctctt tcaaataatt tgttttatct 10020
 ttttttttgt gtgttttgaa gtcaaacagc ttcataaaca atattaaata tcgcaattgt 10080
 tattgcaaat gcattcgtat caggcgccct gatgttttgc ggccaaaact tcgtctgctc 10140
 tttgtcagcg taattgcgtt tgccggctcg gccgtcttgc tcgcacgcgc ttgcaaacaa 10200
 aaagtgaaag agggaaagcc actgtgttgt tgccttttgt gctatcgttg gctgcacaca 10260
 catggcaata agtaaccata ttgtagactt atttatttta gcgttttcgt tgactaatct 10320
 ttgtttaaat aattgcctat ttcgagccaa aatgacgcat aaaggacacg gcaacatgcg 10380
 gtgcgttgag catgcgtacg agatggcgct agagagagcg agataaaaag aaaaaaaca 10440
 ccggcgagtg gcgagacacg aataatacac acacgcacac atgggtcaaag gagtggctcc 10500
 aacgtcggtg acgtcgcgcc cagccacaga ccccgccacg ccccgcecca ccttccttc 10560
 cgctgccccg caccctttc cttccactac cgttttgccg catttggtat tgccatctcg 10620
 cttttttggc tttactttgc tttttgaata agccaagaaa ctgaaatcaa agcggacagt -10680-
 ccgaaaattg aaactattcc aaaaaacaac aaccgcacat gcactgcgtt cggcaaaaga 10740
 cgcagaaatc agcctgtggt ctggcatcat cttaaaatat catcagtatc atcattgcca 10800
 ttataaatac ataagaaaat gagaatacat taaaggata tacatacaat cttgtcata 10860
 gtcaacatat tttgcaacaa aattatctat agataacatg tttttgtaga aaattccact 10920

aactgatttt cgtataaata caaattattc tcattottca aaatactcgc cgacgtcatc 10980
 gcgaaattcc tcagcattct tcgacaaatg aagagagaca gcgagtgcaca caatcttattc 11040
 ttaccgacga gtctttgaaa atggccccgg gaacgggtgaa aaacatatag ccaagaatgg 11100
 agcgatcgcc aggcgatgga aattggcttc aaattgctcc gaatatggcc agttgggtcag 11160
 ttggcattgg attgtggaga gatactagat cagctcgttc tcctttctct cgcattctc 11220
 ctactcgccc gaagacgctt ctttgatcgc ttctttctct aatgtacata ttgatatgta 11280
 tttgggtgtt ggcgacgac agccagcttt aatggccata aaacgtgtct tggtttgtgg 11340
 gccacataac aggcagcgag atctggaaaa atgatgtgac agtggaaatg agaagtaggt 11400
 gcatctgcaa agatttgatt cagagttgat gccattcatg atttttttta gaagtatcat 11460
 ttgtgttttt agaatataga attctagtat gtatgtaagt taataaaacc catttttgcg 11520
 gaaagtagat aaaaaaaca tttttttttt ttactgcact ggatatctgc 11570

<210> 18
 <211> 11251
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA656

<400> 18

cgccaggcga tggaaattgg cttcaaattg ctccgaatat ggccagttgg tcagttggca 60
 ttggattgtg gagagatact agatcagctc gttctccttc tcctccgcac tctcctactc 120
 gcccgaaagac gcttctttga tcgcttcttt ctccaatgta catattgata tgtatttggt 180
 gtttggcgac gatcagccag ctttaaatggc caaaaaacgt gtcttgggtt gtgggccaca 240
 taacaggcag cgagatctgg aaaaatgatg tgacagtgga aatgagaagt aggtgcatct 300
 gcaaagattt gattcagagt tgatgccatt catgattttt tttagaagta tcatttgtgt 360
 ttttagaata tagaattcta gtatgtatgt aagttaataa aaccattttt tgcggaaagt 420
 agataaaaaa aacatttttt ttttttactg cactggatat ctgcggccgc tcatttaaat 480
 ctggccggcc gcaaccattg tgggaaccgt gcgatcaaac aaacgcgaga taccggaagt 540
 actgaaaaac agtcgctcca ggccagtggg aacatcgatg ttttggtttg acggaccctt 600
 tactctcgtc tcatataaac ogaagccagc taagatggta tacttattat catcttgtga 660
 tgaggatgct tctatcaacg aaagtaccgg taaaccgcaa atggttatgt attataatca 720
 aactaaaggc ggagtggaca cgctagacca aatgtgttct gtgatgacct gcagtaggaa 780
 gacgaatagg tggcctatgg cattattgta cggaatgata aacattgcct gcataaatc 840
 ttttattata tacagccata atgtcagtag caaggagaa aaggtcacaa gtcgcaaaaa 900
 atttatgaga aacctttaca tgagcctgac gtcacgtttt atgcgtaagc gtttagaagc 960
 tcctactttg aagagatatt tgccgcgataa tatctctaatt attttgccaa atgaagtgcc 1020

tggtacatca gatgacagta ctgaagagcc agtaatgaaa aaacgtactt actgtactta	1080
ctgccccctct aaaataaggg gaaaggcaaa tgcacgtgac aaaaaatgca aaaaagttat	1140
ttgtcgagag cataatattg atatgtgcc aagttgtttc tgactgacta ataagtataa	1200
tttgtttcta ttatgtataa gttaagctaa ttacttattt tataatacaa catgactggt	1260
tttaaagtac aaaataagtt tatttttgta aaagagagaa tgtttaaaag ttttgttact	1320
ttatagaaga aatttttgagt ttttgttttt ttttaataaa taaataaaca taaataaatt	1380
gtttgttgaa tttattatta gtatgtaagt gtaaatataa taaaacttaa tatctattca	1440
aattaataaa taaacctcga tatacagacc gataaaacac atgcgtcaat ttacgcatg	1500
attatcttta acgtacgtca caatatgatt atctttctag ggtaaataa tagtttctaa	1560
tttttttatt attcagcctg ctgtcgtgaa taccgtatat ctcaacgctg tctgtgagat	1620
tgctgtattc tagccttttt agtttttcgc tcatcgactt gatattgtcc gacacatttt	1680
cgctgatttg cgttttgatc aaagacttga gcagagacac gttaatcaac tgttcaaatt	1740
gatccatatt aacgatatca acccgatgag tatatgggtg gtaaaatata ttttttaacc	1800
ctcttatact ttgcactctg cgtaataacg cgttcgtgta cagacgtaat catgttttct	1860
tttttgata aaactcctac tgagtttgac ctcatattag accctcacia gttgcaaaac	1920
gtggcatttt ttaccaatga agaatttaaa gtatttttaa aaaatttcat cacagattta	1980
aagaagaacc aaaaattaaa ttatttcaac agtttaacg accagttaat caacgtgtac	2040
acagacgct cggaacaaaa cagcagccc gacgtgttg ctaaaattat taaatcaact	2100
tgtgttatag tcacggattt gccgtccaac gtgttcctca aaaagttgaa gaccaacaag	2160
tttacggaca ctatttaatta ttgattttg cccacttca ttttgtgga tcacaatttt	2220
gttatatttt aaacaaagct tggcaactgg cgctgtttta caacgtcgtg actgggaaaa	2280
ccctggcgtt acccaactta atcgccctgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa	2340
tagcgaagag gccgcaccc atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg	2400
ggcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatatggtg	2460
cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac	2520
acccgctgac ggcacctgac gggcttgtct gctccggga tccgcttaca gacaagctgt	2580
gacgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccc tcatcacga aacgcgcgag	2640
acgaaagggc ctctgatac gcctattttt ataggttaat gtcattgataa taatggtttc	2700
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt	2760
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata	2820
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccccta tccctttttt	2880
tgcggcattt tgccttctg tttttgctca ccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc	2940
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat	3000

ccttgagagt ttctgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcacttttta aagttctgct 3060
 atgtggcgcg gtattatccc gtattgaagc cgggcaagag caactcgggc gccgcataca 3120
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcacc ttacggatgg 3180
 catgacagta agagaattat gcagtgcctg cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 3240
 cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 3300
 ggatcatgta actcgccttg atcggtggga accggagctg aatgaagcca taccaaagca 3360
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 3420
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaataagac tggatggagg cggataaagt 3480
 tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 3540
 agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 3600
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3660
 gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3720
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3780
 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 3840
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 3900
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct 3960
 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 4020
 tctagttag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 4080
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgcagtggc gataagtcgt gtcttacggg 4140
 .gttgactca_agacgatagt .taccggataa ggcgacggc tggggctgaa cgggggggtc 4200
 gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4260
 gcattgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 4320
 cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 4380
 tagtctgtc ggggttctgc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 4440
 ggggcgaggc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 4500
 ctggcctttt gctcacatgt tctttctgc gttatccct gattctgtgg ataaccgtat 4560
 taccgccttt gagtgcgtg atacgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 4620
 agtgagcgag gaagcgaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc 4680
 gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tcccagctgg aaagcgggca gtgagcgcaa- 4740
 cgcaattaat gtgagttagc tcaactatta ggcaaccag gctttacact ttatgcttcc 4800
 ggctcgtatg ttgttgga ttgtgagcg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 4860
 ccatgattac gaatttcgac ctgcaggcat gcaagcttgc atgcctgcag gtcgacgctc 4920
 gcgcgacttg gtttgcatt ctttagcgcg cgtcgcgtca cacagcttgg ccacaatgtg 4980

gtttttgtca aacgaagatt ctatgacgtg tttaaagttt aggtcgagta aagcgcaaat 5040
 cttttttaac cctagaaaga tagtctgogt aaaattgacg catgcattct tgaaatattg 5100
 ctctctcttt ctaaatacg cgaatccgtc gctgtgcatt taggacatct cagtcgccc 5160
 ttggagctcc cgtgaggcgt gcttgtcaat gcggttaagt tcaactgatt tgaactataa 5220
 cgaccgcgtg agtcaaaatg acgcatgatt atcttttacg tgacttttaa gatttaactc 5280
 atacgataat tatattgtta ttcatgttc tacttacgtg ataacttatt atatataat 5340
 tttcttgtta tagatatcgt gactaatata taataaaatg ggtagttctt tagacgatga 5400
 gcatatcctc tctgtctctc tgcaaagcga tgacgagctt gttggtgagg attctgacag 5460
 tgaaatatca gatcacgtaa gtgaagatga cgtccagagc gatacagaag aagcgtttat 5520
 agatgaggta catgaagtgc agccaacgtc aagcggtagt gaaatattag acgaacaaaa 5580
 tgttattgaa caaccagggt cttcattggc ttctaacaga atcttgacct tgccacagag 5640
 gactattaga ggtaagaata aacattgttg gtcaacttca aagtccacga ggcgtagccg 5700
 agtctctgca ctgaacattg tcagatcggc ccggggcggc tttttcttga aatattgctc 5760
 tctctttcta aatagcgcga atccgtcgt gtgcatttag gacatctcag tcgccgcttg 5820
 gagctcccaa acgcgccagt ggtagtacac agtactgtgg gtgttcagtt tgaaatcctc 5880
 ttgcttctcc attgtctcgg ttacctttgg tcaaatccat gggttctatt gcctatatac 5940
 tcttgcgatt accagtgatt gcgctattag ctattagatg gattgttggc caaactgtc 6000
 gcttaagtgg ctgggaattg taaccgtagg ccgagtgta atgatcccc ataaaaagt 6060
 ttcgcaatgc ctttattttt tgttgcaaat ctctctttat tctgcggtat tcttcattat 6120
 _tgcggggatg_gggaaagtgt_ttatatagaa gcaacttacg attgaacca aatgcacctg 6180
 acaagcaagg tcaaagggcc agatttttaa atatattatt tagtcttagg actctctatt 6240
 tgcaattaaa ttactttgct acctgagggt taaatcttcc ccattgataa taataattcc 6300
 actatatgtt caattgggtt tcaccgcgt tagttacatg acgagcccta atgagccgtc 6360
 ggtggtctat aaactgtgcc ttacaaatac ttgcaactct tctcgttttg aagtcagcag 6420
 agttattgct aattgctaatt tgctaattgc ttttaactga tttcttcgaa attggtgcta 6480
 tgtttatggc gctattaaca agtatgaatg tcagggttaa ccaggggatg ctttaattgtg 6540
 ttctcaactt caaaggcaga aatgtttact cttgacctg ggtttaggta taatgttate 6600
 aagctcctcg agttaacgtt acgttaacgt taacgttcga ggtcgactct agaactacct 6660
 accgtactcg tcaattccaa gggcatcggg aaacatctgc tcaaactcga agtcggccat 6720
 atccagagcg ccgtaggggg cgagtcgtg gggggtaa at cccggaccg gggaatcccc 6780
 gtcccccaac atgtccagat cgaaatcgtc tagcgcgtcg gcatgcgcca tcgccacgtc 6840
 ctgcgcgtct aagtggagct cgtccccag gctgacatcg gtcggggggg ccgtcgacag 6900
 tctgcgcgtg tgtccgcgg ggagaaagga caggcgcgga gccgccagcc ccgcctcttc 6960

gggggcgctcg tcgtccggga gatcgagcag gccctcgatg gtagaccogt aattgttttt 7020
 cgtacgcgcg cggctgtacg cggggcccga gcccgactcg catttcagtt gcttttccaa 7080
 tccgcagata atcagctcca agccgaacag gaatgccggc tcggctcctt gatgatcgaa 7140
 cagctcgatt gcctgacgca gcagtggggg catcgaatcg gttgttgggg tctcgcgctc 7200
 ctcttttgcg acttgatgct cttggctctc cagcacgcag cccagggtaa agtgaccgac 7260
 ggcgctcaga gcgtagagag cattttccag gctgaagcct tgctggcaca ggaacgcgag 7320
 ctggttctcc agtgtctcgt attgcttttc ggctggggcg gtgccgagat ggactttggc 7380
 accgtctcgg tgggacagca gagcgcagcg gaacgacttg gcgttattgc ggaggaaagtc 7440
 ctgccaggac tcgccttcca acgggcaaaa atgcgtgtgg tggcggtcga gcctctcgat 7500
 ggccagggca tccagcagcg ccgcttatt cttcacgtgc cagtagaggg tgggctgctc 7560
 cagccccagc ttctgcgcca acttgccggg cgtcagtcct tcaatgccaa cttcgttcaa 7620
 cagctccaac gcggagttga tgactttgga cttatccagg cggctgcccc tgggtggtttc 7680
 taaaggtgtt ataaatcaaa ttagttttgt tttttcttga aaactttgcg tttcctttga 7740
 tcaacttacc gccaggggtac cgcagattgt ttagcttggt cagctgcgct tgtttatttg 7800
 cttagctttc gcttagcgac gtgttcactt tgcttggttg aattgaattg tcgctccgta 7860
 gacgaagcgc ctctatttat actccggcgc tcgttttcga gtttaccact ccctatcagt 7920
 gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag 7980
 tcgagtttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactocct 8040
 atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag 8100
 tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca 8160
 ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgaaacctg gcgcgcctct taattaaactc 8220
 gcgttaagat acattgatga gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc 8280
 tttatttctg aaatttctga tgctattgct ttatttctga ccattataag ctgcaataaa 8340
 caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag 8400
 gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtatgg ctgattatga tcagttatct 8460
 agatccggtg gatcttacgg gtccctcacc ttcgcctttt tcttgggtcg agatctcagg 8520
 aacaggtggt ggcggccctc ggtgcgctcg tactgctcca cgatggtgta gtcctcgttg 8580
 tgggaggtga tgtccagctt ggcgtccacg tagtagtagc cgggcagctg cacgggcttc 8640
 ttggccatgt agatggactt gaactccacc aggtagtggc cgcgctcctt cagcttcagg 8700
 gccttggtgg tctcgcctt cagcacgcg tcgcgggggt acaggcgctc ggtggaggcc 8760
 tcccagcca tggctcttct ctgcatcacg gggcgcgcg aggggaagtt cacgcgcagt 8820
 aacttcacct tgtagatgaa gcagccgtcc tgcaggagg agtcctgggt cacggctgcc 8880
 acgcgcgct cctcgaagtt catcacgcg tccacttga agcctcggg gaaggacagc 8940

ttctttagt cggggatgtc ggcggggtgc ttcacgtaca ccttggagcc gtactggaac 9000
 tggggggaca ggatgtccca ggcgaagggc agggggcgcc ccttgggtcac cttcagcttc 9060
 acggtgttgt ggccctcgta ggggcggccc tcgcccctgc cctcgatctc gaactcgtgg 9120
 cggttcacgg tgccctccat gcgcaccttg aagcgcatga actcgggtgat gacgttctcg 9180
 gaggaggcca tgggtggcgac cggtttgcgc ttcttcttgg gtgggggtggg atccccgac 9240
 tgcattttgg attattctgc ggggtcaaat agagatgtgg aaaattagta cgaaatcaaa 9300
 tgagtttcgt tgaaattaca aaactattga aactaacttc ctggctgggg aataaaaatg 9360
 ggaaacttat ttatcgacgc caactttgtt gagaaacccc tattaaccct ctacgaatat 9420
 tggaaacaaag gaaagcgaag aaacaggaac aaaggtagtt gagaaacctg ttccgttgct 9480
 cgtcatcggt ttcataatgc gagtgtgtgc atgtatatat acacagctga aacgcatgca 9540
 tacacattat tttgtgtgta tatggtgacg tcacaactac taagcaataa gaaattttcc 9600
 agacgtggct ttcgtttcaa gcaacctact ctatttcagc taaaaataag tggatttcgt 9660
 tggtaaaata cttcaattaa gcaaagaact aactaactaa taacatgcac acaaatgctc 9720
 gagtgcgttc gtgatttctc gaattttcaa atgcgtcact gcgaatttca caatttgcca 9780
 ataaatcttg gcgaaaatca acacgcaagt tttatttata gatttggttg cgttttgatg 9840
 ccaattgatt gggaaaacaa gatgcgtggc tgccaatttc ttattttgta attacgtaga 9900
 gcgttgaata aaaaaaaaaat ggccgaacaa agaccttgaa atgcagtttt tcttgaaatt 9960
 actcaacgtc ttgttgctct tattactaat tggtaacage gagttaaaaa cttacgtttc 10020
 ttgtgacttt cgagaatgtt cttttaattg tactttaatc accaacaatt aagtataaat 10080
 _ttttcgctga_ttgcgcttta ctttctgctt gtacttgctg ctgcaaagt caattggttt 10140
 tgaaggcgac cgttcgcgaa cgctgtttat ataccttcgg tgtccgttga aaatcactaa 10200
 aaaataccgt agtgttcgta acactttagt acagagaaaa aaaattgtgc cgaaatgttt 10260
 ttgatacgta cgaatacctt gtattaaaat tttttatgat ttctgtgtat cacttttttt 10320
 ttgtgttttt cgtttaaact caccacagta caaaacaata aaatattttt aagacaattt 10380
 caaattgaga cctttctcgt actgacttga cgggtgaat gaggatttct acctagacga 10440
 cctacttctt accatgacat tgaatgcaat gccaccttg atctaaactt acaaaagtcc 10500
 aaggcttggt aggattgggt tttatttagt ttgcttttga aatagcactg tcttctctac 10560
 cggctataat tttgaaactc gcagcttgac tggaaattta aaaagtaatt ctgtgtaggt 10620
 aaagggtgtt ttaaaagtgt gatgtgttga gcgttgcggc aacgactgct atttatgtat 10680
 atattttcaa aacttattgt ttttgaagt ttttaaagg agctatctgg caacgctgcg 10740
 cataatctta cacaagcttt tcttaatcca tttttaagt aaatttggtt ttactctttc 10800
 ggcaataaat tgttaaatcg otttaagtgg gcttacatct ggataagtaa tgaaaacctg 10860
 catattataa tattaataca tataatccac tgtgctttcc cgtgtgtgg ccatatacct 10920

aaaaaagttt attttcgcag agccccgcac ggtcacacta cggttcggcg attttcgatt 10980
 ttggacagta ctgattgcaa gcgcaccgaa agcaaatgg agctggagat tttgaacgcg 11040
 aagaacagca agccgtacgg caaggtgaag gtgccctccg gcgccacgcc catcggcgat 11100
 ctgcgcgccc taattcacaa gaccctgaag cagacccac acgcgaatcg ccagtcgctt 11160
 cgtctggaac tgaagggcaa aagcctgaaa gatacggaca cattggaatc tctgtcgtcg 11220
 cgttccggcg acaagatcgg ggtaccgca t 11251

<210> 19
 <211> 9468
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA710

<400> 19

ggccgctcat ttaaattctgg ccggccgcaa ccattgtggg aaccgtgcga tcaaacaaac 60
 gcgagatacc ggaagtactg aaaaacagtc gctccaggcc agtgggaaca tcgatgtttt 120
 gttttgacgg accccttact ctgctctcat ataaaccgaa gccagctaag atggtatact 180
 tattatcatc ttgtgatgag gatgcttcta tcaacgaaag tacgggtaaa ccgcaaatgg 240
 ttatgtatta taatcaaact aaaggcggag tggacacgct agaccaaattg tgttctgtga 300
 tgacctgcag taggaagacg aataggtggc ctatggcatt attgtacgga atgataaaca 360
 ttgcctgcat aaattctttt attatataca gccataatgt cagtagcaag ggagaaaagg 420
 tccaaagtcg caaaaaattt atgagaaacc ttacatgag cctgacgtca tcgtttatgc 480
 _gtaagcgttt_agaagctcct_actttgaaga_gatatttgcg cgataatata tctaataattt 540
 tgccaaatga agtgccctgg acatcagatg acagtactga agagccagta atgaaaaaac 600
 gtacttactg tacttactgc ccctctaaaa taaggcgaaa ggcaaatgca tcgtgcaaaa 660
 aatgcaaaaa agttatttgt cgagagcata atattgatat gtgccaaagt tgtttctgac 720
 tgactaataa gtataatttg tttctattat gtataagtta agctaattac ttattttata 780
 atacaacatg actgttttta aagtacaaa taagtttatt tttgtaaaag agagaatggt 840
 taaaagtttt gttactttat agaagaaatt ttgagttttt gttttttttt aataaataaa 900
 taaacataaa taaattgttt gttgaattta ttattagtat gtaagtgtaa atataataaa 960
 acttaatatc tattcaaatt aataaataaa cctcgatata cagaccgata aaacacatgc 1020
 gtcaatttta cgcattgatta tctttaacgt acgtcacat atgattatct ttctaggggt 1080
 aaataatagt ttctaatttt tttattattc agcctgctgt cgtgaatacc gtatatctca 1140
 acgctgtctg tgagattgtc gtattctagc ctttttagtt ttctgctcat cgacttgata 1200
 ttgtccgaca cattttcgtc gatttgcgtt ttgatcaaag acttgagcag agacacgtta 1260
 atcaactggt caaattgatc catattaacg atatcaacc gatgcgtata tgggtgcgtaa 1320

aatatatattt ttaaccctct tatactttgc actctgcgtt aatacgcgtt cgtgtacaga 1380
cgtaatcatg ttttcttttt tggataaaac tcctactgag tttgacctca tattagaccc 1440
tcacaagttg caaaacgtgg cattttttac caatgaagaa tttaaagtta ttttaaaaaa 1500
tttcatcaca gatttaaaga agaaccaaaa attaaattat ttcaacagtt taatcgacca 1560
gttaatcaac gtgtacacag acgcgtcggc aaaaaacacg cagcccgacg tgttggttaa 1620
aattattaaa tcaacttggt ttatagtcac ggatttgccg tccaacgtgt tcctcaaaaa 1680
gttgaagacc aacaagttta cggacactat taattatttg attttgcccc acttcatttt 1740
gtgggatcac aattttgtta tattttaaac aaagcttggc actggccgtc gttttacaac 1800
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg ccttgacgca catccccctt 1860
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 1920
gcctgaatgg cgaatggcg cgtatgcgtt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt 1980
cacaccgat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc 2040
cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg 2100
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat 2160
caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca 2220
tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc 2280
ctatttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 2340
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 2400
cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 2460
tgaaagtaaa_agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt ggggtacatc gaactggatc 2520
tcaacagcgg taagatcctt gagagtttcc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 2580
cttttaaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcggg caagagcaac 2640
tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa 2700
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 2760
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaacgcctt 2820
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 2880
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 2940
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 3000
tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ---3060-
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcactggggc 3120
cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 3180
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 3240
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgattttaa acttcatttt taatttaaaa 3300

ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 3360
 cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 3420
 ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtgggtttgtt 3480
 tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 3540
 taccaaatac tgccttctta gtgtagcgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 3600
 caccgcctac atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 3660
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 3720
 gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac accgaactga 3780
 gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3840
 ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa 3900
 acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 3960
 tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgog gcctttttac 4020
 ggttcctggc cttttgctgg ctttttctc acatgttctt tcttgcgtta tcccttgatt 4080
 ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 4140
 ccgagcgcag cgagtcagt agcgaggaag cggagagcg cccaatacgc aaaccgcctc 4200
 tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag 4260
 cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggtct 4320
 tacactttat gcttccggt cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 4380
 caggaaacag ctatgaccat gattacgaat ttcgacctgc aggcacgcaa gcttgcacgc 4440
 ctgcagggtcg_acgctcgcgc gacttggttt gccattcttt agcgcgcgct gcgtcacaca 4500
 gcttggccac aatgtggttt ttgtcaaagc aagattctat gacgtgttta aagtttaggt 4560
 cgagtaaagc gcaaactctt ttaacccta gaaagatagt ctgcgtaaaa ttgacgcacg 4620
 cattcttgaa atattgctct ctctttctaa atagcgcgaa tccgtcgtcg tgcatttagg 4680
 acatctcagt cgcgcgttg agctcccggt aggcgtgctt gtcaatgcgg taagtgtcac 4740
 tgattttgaa ctataacgac cgcgtgagtc aaaatgacgc atgattatct tttacgtgac 4800
 ttttaagatt taactcatac gataattata ttgttatttc atgttctact tacgtgataa 4860
 cttattatat atatatcttc ttgttataga tatcgtgact aatatataat aaaatgggta 4920
 gttctttaga cgatgagcat atcctctctg ctcttctgca aagcgatgac gagcttgctg 4980
 gtgaggattc tgacagtga atatcagatc acgtaagtga agatgacgtc- cagagcgata 5040
 cagaagaagc gtttatagat gaggtacatg aagtgcagcc aacgtcaagc ggtagtga 5100
 tattagacga acaaaatggt attgaacaac caggttcttc attggcttct aacagaatct 5160
 tgaccttgcc acagaggact attagaggta agaataaaca ttgttggtca acttcaaagt 5220
 ccacgaggcg tagcgcgctc tctgcactga acattgtcag atcgccccg gcgcgctttt 5280

tcttgaaata ttgctctctc tttctaaata gcgcgaatcc gtcgctgtgc atttaggaca 5340
 tctcagtcgc cgcttggagc tcccaaacgc gccagtggta gtacacagta ctgtgggtgt 5400
 tcagtttgaa atcctcttgc ttctccattg tctcggttac ctttgggtcaa atccatgggt 5460
 tctattgcct atatactctt gcgattacca gtgattgcgc tattagctat tagatggatt 5520
 gttggccaaa cttgtcgctt aagtggctgg gaattgtaac cgtaggcccg agtgtaatga 5580
 tcccccataa aaagttttcg caatgccttt attttttgtt gcaaactctt ctttattctg 5640
 cggattctt cattattgcg gggatgggga aagtgtttat atagaagcaa cttacgattg 5700
 aacccaaatg cacctgacaa gcaagggtcaa agggccagat ttttaaatat attatttagt 5760
 cttaggactc tctatttgca attaaattac tttgtacct gaggggttaa tcttccccat 5820
 tgataataat aattccacta tatgttcaat tgggtttcac cgcgcttagt tacatgacga 5880
 gccctaata ggcgtcggtg gtctataaac tgtgccttac aaatacttgc aactcttctc 5940
 gttttgaagt cagcagagtt attgctaatt gctaattgct aattgctttt aactgatttc 6000
 ttcgaaattg gtgctatgtt tatggcgcta ttaacaagta tgaatgtcag gtttaaccag 6060
 gggatgctta attgtgttct caacttcaaa ggcagaaatg tttactcttg accatgggtt 6120
 taggtataat gttatcaagc tcctcgagtt aacgttacgt taacgttaac gtccgaggtc 6180
 gactctagaa ctaccaccg tactcgtcaa ttccaagggc atcggtaaac atctgctcaa 6240
 actcgaagtc ggccatatcc agagcgccgt agggggcgga gtcgtggggg gtaaatcccg 6300
 gacccgggga atccccgtcc cccaacatgt ccagategaa atcgtctagc gcgtcggtat 6360
 gcgccatcgc caagtcctcg cgtctaaagt ggagctcgtc cccagggtg acatcggtcg 6420
 _ggggggcggt_cgacagtctg_cgcgtgtgtc ccgcggggag aaaggacagg cgcggagccg 6480
 ccagccccgc ctcttcgggg ggcgtcgtct ccgggagatc gagcaggccc tcgatggtag 6540
 acccgtaatt gtttttcgta cgcgcgcggc tgtacgcggg gcccgagccc gactcgcatt 6600
 tcagttgctt ttccaatccg cagataatca gctccaagcc gaacaggaat gccggctcgg 6660
 ctcttgatg atogaacagc togattgcct gacgcagcag tgggggcac gaatcgggtg 6720
 ttgggtctc gcgctcctct tttgcgactt gatgctcttg gtcctccagc acgcagccca 6780
 gggtaaagt accgacggcg ctccagagcgt agagagcatt ttccaggctg aagccttgct 6840
 ggcacaggaa cgcgagctgg ttctccagtg tctcgtattg cttttcggtc gggcgctgc 6900
 cgagatggac tttggcaccg tctcgggtgg acagcagagc gcagcggaac gacttggcgt 6960
 tattgcggag gaagtcctgc caggactcgc ctccaacgg gcaaaaatgc gtgtgggtggc 7020
 ggtcgagcat ctcgatggcc agggcatcca gcagcgcccg cttattcttc acgtgccagt 7080
 agaggggtgg ctgctccacg ccagcttct gcgccaactt gggggtcgtc agtccctcaa 7140
 tgccaacttc gttcaacagc tccaacggg agttgatgac tttggactta tccaggcggc 7200
 tgcccatggt ggtttctaaa ggtgttataa atcaaattag ttttgtttt tcttgaaaac 7260

tttgcgtttc	ctttgatcaa	cttaccgcca	gggtaccgca	gattgttttag	cttgttcagc	7320
tgcgcttgtt	tatttgccta	gctttcogct	agcgacgtgt	tcactttgct	tgtttgaatt	7380
gaattgtcgc	tccgtagacg	aagcgctctt	atttatactc	cggcgctcgt	tttcgagttt	7440
accactccct	atcagtgata	gagaaaagtg	aaagtcgagt	ttaccactcc	ctatcagtg	7500
tagagaaaag	tgaaagtcga	gtttaccact	ccctatcagt	gatagagaaa	agtgaagtc	7560
gagtttacca	ctccctatca	gtgatagaga	aaagtgaag	tcgagtttac	cactccctat	7620
cagtgataga	gaaaagtgaa	agtcgagttt	accactccct	atcagtgata	gagaaaagtg	7680
aaagtcgagt	ttaccactcc	ctatcagtg	tagagaaaag	tgaaagtcga	aacctggcgc	7740
gcctcttaat	taactcgcgt	taagatacat	tgatgagttt	ggacaaacca	caactagaat	7800
gcagtgaaaa	aaatgcttta	tttgtgaaat	ttgtgatgct	attgctttat	ttgtaacct	7860
tataagctgc	aataaacaag	ttaacaacaa	caattgcatt	cattttatgt	ttcaggttca	7920
gggggaggtg	tgggaggttt	tttaagcaa	gtaaaacctc	tacaaatgtg	gtatggctga	7980
ttatgatcag	ttatctagat	ccggtggatc	ttacgggtcc	tccaccttcc	gctttttctt	8040
gggtcgagat	ctcaggaaca	ggtggtggcg	gccctcgggtg	cgtcgtact	gctccacgat	8100
ggtgtagtcc	tcgttgtggg	aggtgatgtc	cagcttggcg	tccacgtagt	agtagccggg	8160
cagctgcacg	ggcttcttgg	ccatgtagat	ggacttgaac	tccaccaggt	agtggccgcc	8220
gtccttcagc	ttcagggcct	tgtgggtctc	gcccttcagc	acgcgctcgc	gggggtacag	8280
gcgctcgggtg	gagggcctcc	agcccatggg	cttcttctgc	atcacggggc	cgtcggaggg	8340
gaagttcacg	ccgatgaact	tcaccttgta	gatgaagcag	cgtcctgca	gggaggagtc	8400
-ctgggtcacg	-gtcgccacgc	cgcgctctc	gaagttcac	acgcgctccc	acttgaagcc	8460
ctcggggaag	gacagcttct	tgtagtgggg	gatgtcggcg	gggtgcttca	cgtacacctt	8520
ggagccgtac	tggaaactggg	gggacaggat	gtcccaggcg	aagggcaggg	ggccgcctt	8580
ggtcaccttc	agcttcacgg	tgttgtggcc	ctcgtagggg	cggccctcgc	cctcgccctc	8640
gatctcgaac	tcgtggccgt	tcacgggtgc	ctccatgcgc	accttgaagc	gcatgaactc	8700
ggtgatgacg	ttctcggagg	aggccatggg	ggcgaccggg	ttgcgcttct	tcttgggtgg	8760
ggtgggatcc	tcgtcgaca	tcttgaatta	gtctgcaaga	aaagaaaaaa	aacaattcaa	8820
actacattct	cattccatac	attatactaa	gtaaacgaca	aattttattg	cgtccatcta	8880
tttagtgacg	ttaaagaaaa	ctgtataaga	ttcataattc	actgttccca	atttctgttt	8940
cogaattgat	-cgatgcgagt	ggacactttg	aaatgtgcgt	ccaataaact	tatttcttat	9000
ttagtagtgt	ttattaacat	ctgcagtaca	ctaaattccg	aaaaatgttt	ttttttataa	9060
aaaatttcac	ttcactagtt	atgcaacaat	tatgtaacgt	aacacgttat	cattagcgta	9120
ttattaaaaa	aaaaaaacac	tcaaacatat	gtaatactta	aaggtaaagg	gacggagaac	9180
cttcgaaatt	caaatcttac	aaataaataa	atatgttttt	ttttctttcg	caattttaaa	9240

ES 2 447 422 T3

```

attaaaactt acatagtatt attaaataag tgacaagtac gtagatgcga atgcgcactg 9300
ttcgagcaca ccttagtaaa tgagaaccga ctctgtgagga taaactatat aaaagagccg 9360
ttatcacaat ttacacagta tcggctccag tttgtttttc caccaatcgc gggctgactc 9420
agtttttgtc accatatatg gtaacgcgca cgctatcagg taccatgc 9468

```

<210> 20
 <211> 10140
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA928

<400> 20

```

ggcgcgtcat ttaaactctgg ccggccgcaa ccattgtggg aaccgtgcga tcaaacaaac 60
gcgagatacc ggaagtactg aaaaacagtc gctccaggcc agtgggaaca tcgatgtttt 120
gttttgacgg accccttact ctctgtctcat ataaaccgaa gccagctaag atggtatact 180
tattatcacc ttgtgatgag gatgcttcta tcaacgaaag taccggtaaa ccgcaaatgg 240
ttatgtatta taatcaaact aaaggcggag tggacacgct agaccaaagt tgttctgtga 300
tgacctgcag taggaagacg aataggtggc ctatggcatt attgtacgga atgataaaca 360
ttgcctgcat aaattctttt attatataca gccataatgt cagtagcaag ggagaaaagg 420
tccaaagtcg caaaaaattt atgagaaacc tttacatgag cctgacgtca tcgtttatgc 480
gtaagcgttt agaagctcct actttgaaga gatatttgcg cgataaatatc tctaataattt 540
tgccaaatga agtgccctgg acatcagatg acagtactga agagccagta atgaaaaaac 600
--gtacttactg tacttactgc ccctctaaaa taaggcgaaa ggcaaatgca tcgtgcaaaa 660
aatgcaaaaa agttatttgt cgagagcata atattgatat gtgccaaagt tgtttctgac 720
tgactaataa gtataatttg tttctattat gtataagtta agctaattac ttattttata 780
atacaacatg actgttttta aagtacaaaa taagtttatt tttgtaaaag agagaatgtt 840
taaaagtttt gtacttttat agaagaaatt ttgagttttt gttttttttt aataaataaa 900
taaacataaa taaattgttt gttgaattta ttattagtat gtaagtgtaa atataataaa 960
acttaatatc tattcaaatt aataaataaa cctcgatata cagaccgata aaacacatgc 1020
gtcaatttta cgcattgatta tctttaacgt acgtcacaat atgattatct ttctagggtt 1080
aaataatagt ttctaatttt tttattatc agcctgctgt cgtgaatacc gtatatctca 1140
acgetgtctg tgagattgtc gtattctagc ctttttagtt tttcgctcat cgacttgata---1200
ttgtccgaca cattttcgtc gatttgcgtt ttgatcaaag acttgagcag agacacgtta 1260
atcaactgtt caaattgatc catattaacg atatcaacco gatgcgtata tgggtgcgtaa 1320
aatatatattt ttaaccctct tatactttgc actctgcgtt aatacgcgtt cgtgtacaga 1380
cgtaatcatg ttttcttttt tggataaaac tcctactgag tttgacctca tattagaccc 1440

```

tcacaagttg caaaacgtgg ctttttttac caatgaagaa tttaaagtta ttttaaaaaa	1500
tttcatcaca gatttaaaga agaaccaaaa attaaattat ttcaacagtt taatcgacca	1560
gttaatcaac gtgtacacag acgctgcggc aaaaaacacg cagcccgacg tgttggctaa	1620
aattattaaa tcaacttggt ttatagtcac ggatttgccg tccaacgtgt tcctcaaaaa	1680
gttgaagacc aacaagttta cggacactat taattatttg attttgcccc acttcatttt	1740
gtgggatcac aattttgtta ttttttaaac aaagcttggc actggccgctc gttttacaac	1800
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacct aacttaatcg ccttgacgca catccccctt	1860
tgcgcagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg ccttcccaa cagttgcgca	1920
gcctgaatgg cgaatggcg cgtatgcggc attttctcct tacgcatctg tgcggtattt	1980
cacaccgcat atggtgcact ctgagtacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc	2040
cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg	2100
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat	2160
caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca	2220
tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc	2280
ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct	2340
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg	2400
cccttatctc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg	2460
tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt ggggttacatc gaactggatc	2520
tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca	2580
cttttaaagt_tctgctatgt_ggcgcggtat_tatcccgat tgacgcggg caagagcaac	2640
tgggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa	2700
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg	2760
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt	2820
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg	2880
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc	2940
gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga	3000
tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctgggtta	3060
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg tatcattgca gcactggggc	3120
cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg	3180
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt	3240
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa	3300
ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt	3360
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt	3420

ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 3480
 tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 3540
 taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ocacttcaag aactctgtag 3600
 caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 3660
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 3720
 gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 3780
 gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3840
 ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 3900
 acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt 3960
 tgtgatgtc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 4020
 ggttctctgg cttttgctgg ccttttctc acatgttctt tctgctgta tccccgatt 4080
 ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc agccgaacga 4140
 ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggagagcg cccaatacgc aaaccgcctc 4200
 tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag 4260
 cgggcagtg ggcgaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggctt 4320
 tacactttat gcttcgggt cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 4380
 caggaaacag ctatgaccat gattacgaat ttccacctgc aggcattgca gcttgcattg 4440
 ctgcaggctc acgctcgcgc gacttgggtt gccattcttt agcgcgcgtc gcgtcacaca 4500
 gcttggccac aatgtgggtt ttgtcaaacg aagattctat gacgtgttta aagtttaggt 4560
 cgagtaaagc gcaaatcttt tttaacctta gaagatagt ctgcgtaaaa ttgacgcattg 4620
 cattcttgaa atattgctct ctctttctaa atagcgcgaa tccgtcgtg tgcatttagg 4680
 acatctcagt cgcgccttg agctcccggt aggcgtgctt gtcaatgcgg taagtgtcac 4740
 tgattttgaa ctataacgac cgcgtgagtc aaaatgacgc atgattatct ttacgtgac 4800
 ttttaagatt taactcatac gataattata ttgttatttc atgttctact tacgtgataa 4860
 cttattatat atatatcttc ttgttataga tatcgtgact aatatataat aaaatgggta 4920
 gttctttaga cgatgagcat atctctctg ctcttctgca aagcgatgac gagcttgttg 4980
 gtgaggattc tgacagtga atatcagatc acgtaagtga agatgacgac cagagcgata 5040
 cagaagaagc gtttatagat gaggtacatg aagtcagcc aacgtcaagc ggtagtgaaa 5100
 tattagacga acaaatgtt attgaacaac caggttcttc attggctctt aacagaatct 5160
 tgaccttgcc acagaggact attagaggta agaataaaca ttgttggtca acttcaaagt 5220
 ccacgaggcg tagccgagtc tctgcactga acattgtcag atcggcccg ggcgcgtttt 5280
 tcttgaaata ttgctctctc ttctaaata gcgcgaatcc gtcgctgtgc atttaggaca 5340
 tctcagtcgc cgttggagc tcccaaacgc gccagtggta gtacacagta ctgtgggtgt 5400

tcagtttgaa atcctcttgc ttctccattg tctcggttac ctttggtaaa atccatgggt 5460
tctattgcct atatactctt gcgattacca gtgattgcgc tattagctat tagatggatt 5520
gttggccaaa cttgtcgctt aagtggctgg gaattgtaac cgtaggcccg agtgtaatga 5580
tccccataa aaagttttcg caatgccttt attttttgtt gcaaatctct ctttattctg 5640
cggatattctt cattattgctg gggatgggga aagtgtttat atagaagcaa cttacgattg 5700
aaccctaatg cacctgacaa gcaaggtaaa agggccagat ttttaaatat attatttagt 5760
cttaggactc tctatttgca attaaattac tttgctacct gaggggtaaa tcttcccat 5820
tgataataat aattccacta tatgttcaat tgggtttcac cgcgcttagt tacatgacga 5880
gccctaataa gccgtcggtg gtctataaac tgtgcttac aaatacttgc aactcttctc 5940
gttttgaagt cagcagagt attgctaatt gctaattgct aattgctttt aactgatttc 6000
ttcgaaattg gtgctatgtt tatggcgcta ttaacaagta tgaatgtcag gtttaaccag 6060
gggatgctta attgtgttct caacttcaaa ggcagaaatg tttactcttg accatgggtt 6120
taggtataat gttatcaagc tctcagagt aacgttacgt taacgttaac gttcagagtc 6180
gactctagaa ctaccaccg tactcgtcaa ttccaagggc atcggtaaac atctgctcaa 6240
actcgaagtc ggccatatcc agagcgccgt agggggcgga gtcgtggggg gtaaatcccg 6300
gacccgggga atcccgctcc cccaacatgt ccagatcgaa atcgtctagc gcgtcggcct 6360
ggcccatcgc cacgtcctcg cgtctaaagt ggagctcgtc cccaggtctg acatcggtcg 6420
ggggggccgt cgacagtctg cgcgtgtgtc ccgcggggag aaaggacagg cgcggagccg 6480
ccagccccgc ctcttcgggg gcgtcgtctc ccgggagatc gagcaggccc tcgatggtag 6540
accgtaatt gtttttcgta cgcgcggggc tgtacgcggg gcccgagccc gactcgcatt 6600
tcagttgctt ttccaatccg cagataatca gctccaagcc gaacaggaat gccggctcgg 6660
ctccttgatg atcgaacagc tcgattgcct gacgcagcag tgggggcacg gaatcggttg 6720
ttggggctct gcgtcctct tttgogactt gatgctcttg gtctctcagc acgcagccca 6780
gggtaaagtg accgacggcg ctcagagcgt agagagcatt ttccaggctg aagccttgc 6840
ggcacaggaa cgcgagctgg ttctccagtg tctcgtattg cttttcggtc gggcgctgct 6900
cgagatggac tttggcaacc tctcgggtgg acagcagagc gcagcggaac gacttggcgt 6960
tattgcggag gaagtcctgc caggactcgc cttccaacgg gcaaaaatgc gtgtggtggc 7020
ggtcagagcat ctcgatggcc agggcatcca gcagcggccg cttattcttc acgtgccagt 7080
agaggggtgg ctgctccacg cccagcttct gcgccaactt gggggtcgtc agtccctcaa 7140
tgccaacttc gttcaacagc tccaacggcg agttgatgac tttggactta tccaggcggc 7200
tgcccatggg ggtttctaaa ggtgttataa atcaaattag ttttgtttt tcttgaaaac 7260
tttgcgttct ctttgatcaa cttacggcca gggtaaccga gattgtttag cttgttcagc 7320
tgcgcttggt tatttgctta gcttctcgtt agcgacgtgt tcactttgct tgtttgaatt 7380

gaattgtcgc tccgtagacg aagcgccctct atttatactc cggcgctcgt ttccgagttt 7440
 accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtgata 7500
 tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaaagtc 7560
 gagtttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagtttac cactccctat 7620
 cagtgataga gaaaagtgaa agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg 7680
 aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtgata tagagaaaag tgaaagtcga aacctggcgc 7740
 gcctcttaat taactcgcgt taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat 7800
 gcagtgaaaa aaatgcttta ttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat 7860
 tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca 7920
 gggggaggtg tgggaggtt tttaaagcaa gtaaaacctc taaaaatgtg gtatggctga 7980
 ttatgatcag ttatctagat ccggtggatc ttacgggtcc tccaccttcc gctttttctt 8040
 gggtcgagat cttaggaaca ggtggtggcg gccctcggtg cgctcgtact gctccacgat 8100
 ggtgtagtcc tcgttgtggg aggtgatgtc cagcttggcg tccaogtagt agtagccggg 8160
 cagctgcacg ggcttcttgg ccatgtagat ggacttgaac tccaccaggt agtggccgcc 8220
 gtccctcagc ttcagggcct tgtgggtctc gcccttcagc acgcgctcgc gggggtacag 8280
 gcgctcggtg gaggcctccc agcccatggt ctctctctgc atcacggggc cgtcggaggg 8340
 gaagttcacg ccgatgaact tcaccttgta gatgaagcag ccgtcctgca gggaggagtc 8400
 ctgggtcacg gtcgccacgc cgcgctctc gaagttcatc acgcgctccc acttgaagcc 8460
 ctgggggaag gacagcttct tgtagtggg gatgtcggcg ggggtgcttca cgtacacctt 8520
 ggagccgtac tgggaactggg gggacaggat gtcccaggcg aagggcaggg ggccgccctt 8580
 ggtcaccttc agcttcacgg tgttgtggcc ctctagggg cggccctcgc cctcgcctc 8640
 gatctgaac tcgtggccgt tcacggtgcc ctccatgcgc acctgaagc gcatgaactc 8700
 ggtgatgacg ttctcggagg aggccatggt ggcgaccggt ttgcgcttct tottgggtg 8760
 ggtgggatct cccatggtgg cctgaatctc aacttgacc tgaaggtagt gcagcaagga 8820
 tgagcaaaaag ggaagaacct agaaaagaac gggaaaactt accccaatta gaattgcttg 8880
 tcgccgccag tgtcaacttg caactgaaac aatatccaac atgaacgtca atttatactg 8940
 ccctaattggc gaacacgata acaatatctt ttttattatg ccctctaaaa ccaacgcggt 9000
 tatcgtttat ttattcaaat tagatataga acatccgccg acatacaatg ttaatgcaaa 9060
 aacgogtttg-gtgagcggat acgaaaacag tcggccgata aacattaatc tgaggtcgat 9120
 aacaccgtcc ttgaacggaa cacgaggagc gtacgtgatc agctgcattc gcgcgccgcg 9180
 cctttatcga gatttatctg catacaacaa gtacactgcg ccgttgggat ttgtggtaac 9240
 gcgcacacat gcagagctgc aagtgtggca cattttgtct gtgcgcaaaa cctttgaagc 9300
 caaaagtacg aggtccgtta cgggcatgct agcgcacacg gacaatggac ccgacaaatt 9360

ctacgccaaag gattttaatga taatgtcggg caacgtatcc gttcattttta tcaataacct 9420
 acaaaaatgt cgcgcgcac acaaagacat cgatatatct aaacattttat gtcccgaact 9480
 gcaaatacgat aatagtgttg tgcaacctcg agcgtccggt tgatttaacg tatagcttgc 9540
 aatgaatta ttttaattatc aatcatgttt tacgcgtaga attctaccog taaagcgagt 9600
 ttagttatga gccatgtgca aaacatgaca tcagctttta tttttataac aaatgacatc 9660
 atttcttgat tgtgttttac acgtagaatt ctactcgtaa agcgagttca gttttgaaaa 9720
 acaaatagaca tcactctttt gattgtgctt tacaagtaga attctaccog taaatcaagt 9780
 tcggttttga aaaacaaatg agtcataatt tatgatatca tattgcaaaa caaatgactc 9840
 atcaatcgat cgtgcgttac acgtagaatt ctactcgtaa agcgagttta tgagccgtgt 9900
 gcaaaacatg acatcatctc gatttgaaaa acaaatagaca tcactccactg atcgtgcatt 9960
 acaagtagaa ttctactcgt aaagccagtt cggttatgag cgtgtacaa aacatgacat 10020
 cagattatga ctcatacttg attgtgtttt acgcgtagaa ttctactcgt aaagccagtt 10080
 caatttttaa aacaaatgac atcatccaaa ttaataaatg acaagcaatg ggtaccatgc 10140

<210> 21
 <211> 10522
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA1124

<400> 21

gtgggtttttg tcaaacgaag attctatgac gtgttttaag tttagggtcga gtaaagcgca 60
 -aatctttttt aaccctagaa agatagtctg cgtaaaattg acgcatgcat tcttgaaata 120
 ttgctctctc tttctaaata gcgcgaatcc gtcgctgtgc atttaggaca tctcagtcgc 180
 cgcttgagc tcccgtaggg cgtgcttgtc aatgcggtaa gtgtcactga ttttgaacta 240
 taacgaccgc gtgagtcaaa atgacgcag attatctttt acgtgacttt taagatttaa 300
 ctcatacgat aattatattg ttatttcatt ttctacttac gtgataactt attatatata 360
 tattttcttg ttatagatat cgtgactaat atataataaa atgggtagtt ctttagacga 420
 tgagcatatc ctctctgctc ttctgcaaag cgatgacgag cttgttggtg aggattctga 480
 cagtgaata tcagatcacg taagtgaaga tgacgtccag agcgatacag aagaagcggt 540
 tatagatgag gtacatgaag tgcagccaac gtcaagcggg agtgaaatat tagacgaaca 600
 aatgtttatt gaacaaccag gttcttcatt ggcttctaac agaattctga ccttgccaca 660
 gaggactatt agaggtaaga ataaacattg ttggtcaact tcaaagtcca cgaggcgtag 720
 ccgagtctct gcaactgaaca ttgtcagatc ggcccgggcg ccgtttttct tgaaatatgt 780
 ctctctcttt ctaaataagc cgaatccgtc gctgtgcatt taggacatct cagtcgcgc 840
 ttggagctcc caaacgcgc agtggttagta cacagtactg tgggtgttca gtttgaaatc 900

ctcttgcttc tccattgctc cgggtacctt tgggtcaaac catgggttct attgcctata 960
 tactcttgcg attaccagtg attgcgctat tagctattag atggattggt ggccaaactt 1020
 gtgccttaag tggctgggaa ttgtaaccgt agggcccgagt gtaatgatcc cccataaaaa 1080
 gttttcgcaa tgcctttatt ttttggtgca aatctctctt tattctgcgg tattcttcat 1140
 tattgcgggg atggggaaag tgtttatata gaagcaactt acgattgaac ccaaagtcac 1200
 ctgacaagca aggtcaaagg gccagatttt taaatatatt atttagtctt aggactctct 1260
 atttgcaatt aaattacttt gctacctgag gggttaaact tccccattga taataataat 1320
 tccactatat gttcaattgg gtttcaccgc gcttagttac atgacgagcc ctaatgagcc 1380
 gtccgtgggtc tataaactgt gccttacaaa tacttgcaac tcttctcggt ttgaagtcag 1440
 cagagttatt gctaattgct aattgctaatt tgcctttaac tgatttcttc gaaattgggtg 1500
 ctatgtttat ggcgctatta acaagtatga atgtcagggt taaccagggg atgcttaatt 1560
 gtgttctcaa cttcaaaggc agaaatgttt actcttgacc atgggttttag gtataatggt 1620
 atcaagctcc tcgagttaac gttacgttaa cgttaacgtt cgaggctcgac tctagaacta 1680
 cccaccgtac tcgtcaattc caagggcatc ggtaaacatc tgcctaaact cgaagtcggc 1740
 catatccaga ggcgcgtagg gggcggagtc gtggggggta aatcccgac cgggggaatc 1800
 cccgtcccc aacatgtcca gatcgaaatc gtctagcgcg tcggcatgcg ccatcgccac 1860
 gtctctgcgc tctaagtga gctcgtcccc caggctgaca tcggtcgggg gggcgcgcga 1920
 cagtctgcgc gtgtgtcccg cggggagaaa ggacaggcgc ggagccgcca gcccgcctc 1980
 ttccggggcg tcgtcgtccg ggagatcgag caggccctcg atggtagacc cgtaattggt 2040
~~ttctgta~~tcgc gcgggctgt acgcggggcc cgagcccgac tcgcatctca gttgcttttc 2100
 caatccgcag ataatcagct ccaagccgaa caggaatgcc ggctcggctc cttgatgac 2160
 gaacagctcg attgcctgac gcagcagtgg gggcatcgaa tcggttggtg gggctctgcg 2220
 ctctctttt gcgacttgat gctcttggtc ctccagcacg cagcccaggg taaagtgacc 2280
 gacggcgctc agagcgtaga gagcattttc caggctgaag ccttgctggc acaggaacgc 2340
 gagctgggtc tccagtgtct cgtattgctt ttcggtcggg cgcgtgccga gatggacttt 2400
 ggcaccgtct cgggtgggaca gcagagcgca gcggaacgac ttggcgttat tgcggaggaa 2460
 gtctgccag gactcgctt ccaacgggca aaaatgcgtg tgggtggcgt cgagcatctc 2520
 gatggccagg gcatccagca gcgcccgtt attcttcacg tgccagtaga ggggtgggctg 2580
 ctccacgcc agcttctgcg ccaacttgcg ggtcgtcagt cctcaatgc caacttcgtt 2640
 caacagctcc aacgcggagt tgatgacttt ggacttatcc aggcggctgc ccatgggtgt 2700
 ttctaaagggt gttataaatc aaattagttt tgtttttct tgaaaacttt gcgttctctt 2760
 tgatcaactt accgccaggg taccgcagat tgtttagctt gttcagctgc gcttgtttat 2820
 ttgcttagct ttcgcttagc gacgtgttca ctttgcttgt ttgaattgaa ttgtcgtcc 2880

gtagacgaag cgctcttatt tatactccgg cgctcgtttt cgagtttacc actccctatc 2940
 agtgatagag aaaagtgaag gtcgagttta ccactcccta tcagtgatag agaaaagtga 3000
 aagtcgagtt taccactccc tatcagtgat agagaaaagt gaaagtcgag tttaccactc 3060
 cctatcagtg atagagaaaa gtgaaagtcg agttttaccac tccctatcag tgatagagaa 3120
 aagtgaagtc cgagtttacc actccctatc agtgatagag aaaagtgaag gtcgagttta 3180
 ccactcccta tcagtgatag agaaaagtga aagtcgaaac ctggcgcgcc ccggccatcg 3240
 agaaagagag agagaagaga agagagagaa cattcgagaa agagagagag aagagaagag 3300
 agagaacata ctccctatca gtgatagaga agtccctatc agtgatagag atgtccctat 3360
 cagtgataga gagttcccta tcagtgatag agacgtccct atcagtgata gagaagtcct 3420
 tatcagtgat agagagatcc ctatcagtg tagagatttc cctatcagtg atagagaggt 3480
 ccctatcagt gatagagact tccctatcag tgatagagaa atccctatca gtgatagaga 3540
 catccctatc agtgatagag aactccctat cagtgataga gacctcccta tcagtgatag 3600
 agatcgatgc ggcgcgatgg taaccattgc ttgtcattta ttaatttggg tgatgtcatt 3660
 tgttttttaa attgaactgg ctttacgagt agaattctac gcgtaaaaca caatcaagta 3720
 tgagtcataa tctgatgtca tgttttgtac acggctcata accgaactgg ctttacgagt 3780
 agaattctac ttgtaatgca cgatcagtg atgatgtcat ttgtttttca aatcgagatg 3840
 atgtcatgtt ttgcacacgg ctcataaact cgcttttacg gtagaattct acgtgtaacg 3900
 caogatcgat tgatgagtc tttgttttgc aatatgatat catacaatat gactcatttg 3960
 tttttcaaaa ccgaacttga tttacgggta gaattctact tgtaaagcac aatcaaaaag 4020
 atgatgtcat ttgtttttca aaactgaact cgcttttacg gtagaattct acgtgtaaaa 4080
 cacaatcaag aaatgatgtc atttggtata aaaataaaaag ctgatgtcat gttttgcaca 4140
 tggctcataa ctaaactcg tttacgggta gaattctacg cgtaaaacat gattgataat 4200
 taaataattc atttgcaagc tatacgttaa atcaaacgga cgctcgaggt tgcacaacac 4260
 tattatogat ttgcagttcg ggacataaat gtttaaatat atcgatgtct ttgtgatgcg 4320
 cgcgacattt ttgtaggtta ttgataaaat gaacggatac gttgcccga acttatcatta 4380
 aatccttggc gtagaatttg tgggtccat tgtccgtgtg cgctagcatg cccgtaacgg 4440
 acctgtact tttggcttca aagggtttgc gcacagacaa aatgtgccac acttgcaget 4500
 ctgcatgtgt gcgcgttacc acaaatcca acggcgagtc gtacttgttg tatgcaata 4560
 aatctcgata aaggcgcggc gcgcgaatgc agetgatcac gtacgtcct cgtgttcctg 4620
 tcaaggacgg tggtatcgac ctgagattaa tggttatcgg cagactgttc tcgtatccgc 4680
 tcaccaaacy cgtttttgca ttaacattgt atgtcggcgg atgttctata tctaatttga 4740
 ataaataaac gataaccgag ttgggttttag agggcataat aaaagaaata ttgttatcgt 4800
 gttcgcatt agggcagtat aaattgacgt tcatgttggg tattgtttca gttgcaagtt 4860

gacactggcg ggcacaagca attctaattg gggtaagttt tcccgttctt ttctgggttc 4920
 ttcccttttg ctcatccttg ctgcactacc ttcaggtgca agttgagatt caggccacca 4980
 tgggagatcc caccacccc aagaagaagc gcaaaccggt cgccaccatg gcctcctccg 5040
 agaacgtcat caccgagttc atgcgcttca aggtgcgcat ggagggcacc gtgaacggcc 5100
 acgagttcga gatcgagggc gagggcgagg gccgccccta cgagggccac aacaccgtga 5160
 agctgaaggt gaccaagggc ggccccctgc ctttcgcctg ggacatcctg tccccccagt 5220
 tccagtacgg ctccaagggtg tacgtgaagc accccgccga catccccgac tacaagaagc 5280
 tgtccttccc cgagggcttc aagtgggagc gcgtgatgaa cttcgaggac ggcggcggtg 5340
 cgaccgtgac ccaggactcc tccctgcagg acggctgctt catctacaag gtgaagttca 5400
 tcggcgtgaa cttcccctcc gacggccccg tgatgcagaa gaagaccatg ggctgggagg 5460
 cctccaccga ggcctgtac ccccgcgagc gcgtgctgaa gggcgagacc cacaaggccc 5520
 tgaagctgaa ggacggcggc cactacctgg tggagttcaa gtccatctac atggccaaga 5580
 agcccggtgca gctgcccggc tactactacg tggacgcaa gctggacatc acctcccaca 5640
 acgaggacta caccatcgtg gagcagtacg agcgcaccca gggccgccac cacctgttcc 5700
 tgagatctcg acccaagaaa aagcgggaag tggaggaccc gtaagatcca ccggatctag 5760
 ataactgac ataactcagc ataccacatt tgtagagggt ttacttgctt taaaaaacct 5820
 cccacacctc cccctgaacc tgaacataa aatgaatgca attgtgtgtg ttaacttggt 5880
 tattgcagct tataatgggt acaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc 5940
 atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttaacgcga 6000
 _gttaattaag gccgctcatt taaatctggc cggccgcaac cattgtggga accgtgcgat 6060
 caaacaaacg cgagataccg gaagtactga aaacacgtcg ctccaggcca gtgggaacat 6120
 cgatgttttg ttttgacgga ccccttactc tcgtctcata taaaccgaag ccagctaaga 6180
 tgggtatactt attatcatct tgtgatgagg atgcttctat caacgaaagt accggtaaac 6240
 cgcaaatggt tatgtattat aatcaaaacta aaggcggagt ggacacgcta gaccaaatgt 6300
 gttctgtgat gacctgcagt aggaagacga ataggtggcc tatggcatta ttgtacggaa 6360
 tgataaacat tgctgcata aattctttta ttatatacag ccataatgtc agtagcaagg 6420
 gagaaaaggt ccaaagtcgc aaaaaattta tgagaaacct ttacatgagc ctgacgtcat 6480
 cgttttatgcg taagcgttta gaagctccta ctttgaagag atatttgccg gataatatct 6540
 ctaatatattt gccaaatgaa gtgcctggta catcagatga cagtactgaa gagccagtaa 6600
 tgaaaaaacg tacttactgt acttactgcc cctctaaaat aaggcgaaag gcaaatgcat 6660
 cgtgcaaaaa atgcaaaaaa gttatttgtc gagagcataa tattgatatg tgccaaagtt 6720
 gtttctgact gactaataag tataatttgt ttctattatg tataagttaa gctaattact 6780
 tattttataa tacaacatga ctgtttttta agtacaaaat aagtttattt ttgtaaaaga 6840

gagaatgttt aaaagttttg ttactttata gaagaaatth tgagtttttg ttttttttta 6900
 ataaataaat aaacataaat aaattgtttg ttgaatttat tattagtatg taagtgtaaa 6960
 tataataaaa cttaatatct attcaaatta ataaataaac ctgatatac agaccgataa 7020
 aacacatgcg tcaattttac gcatgattat ctttaacgta cgtcacaata tgattatctt 7080
 tctagggtta aataatagtt tctaattttt ttattattca gcctgctgtc gtgaataccg 7140
 tatatctcaa cgctgtctgt gagattgtcg tattctagcc tttttagttt ttcgctcatc 7200
 gacttgatat tgtccgacac attttcgctg atttgcgttt tgatcaaaga cttgagcaga 7260
 gacacgttaa tcaactgttc aaattgatcc atattaacga tatcaaccgc atgcttatat 7320
 ggtgcgtaaa atatatTTTT taaccctctt atactttgca ctctgcgtta atacgcgttc 7380
 gtgtacagac gtaatcatgt tttctttttt ggataaaact cctactgagt ttgacctcat 7440
 attagaccct cacaagttgc aaaacgtggc attttttacc aatgaagaat ttaaagttat 7500
 tttaaaaaat ttcattcacag atttaaagaa gaacaaaaa ttaaattatt tcaacagttt 7560
 aatcgaccag ttaatcaacg tgtacacaga cgcgtcggca aaaaacacgc agcccgacgt 7620
 gttggctaaa attattaaat caacttgtgt tatagtcacg gatttgccgt ccaacgtgtt 7680
 cctcaaaaag ttgaagacca acaagtttac ggacactatt aattatttga ttttgcccca 7740
 cttcattttg tgggacaca attttgttat attttaaaca aagcttggca ctggccgtcg 7800
 ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac 7860
 atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac 7920
 agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt 7980
 .gcggatattt .acaccgcata tgggtgcactc tcagtacat ctgctctgat gccgcatagt 8040
 taagccagcc ccgacaccgc ccaacaccgc ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc 8100
 cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt 8160
 caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgcta tttttatagg 8220
 ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc 8280
 gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 8340
 aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 8400
 tccgtgtgc ccttattccc ttttttgagg cattttgcct tcctgttttt gctcaccacg 8460
 aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gggtacatcg 8520
 .aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 8580
 tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgatt gacgccgggc 8640
 aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttgggttgag tactcaccag 8700
 tcacagaaaa gcatccttac gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 8760
 ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 8820

```

taaccgcttt tttgcacaac atgggggagc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg 8880
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 8940
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 9000
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 9060
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag 9120
cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 9180
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 9240
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt 9300
aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac 9360
gtgagttttc gttccactga gcgctcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 9420
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 9480
tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 9540
gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 9600
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagtg gctgctgcca 9660
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttggt actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 9720
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 9780
ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa 9840
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 9900
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgctggggt tcgccacctc tgacttgagc 9960
gtcgattttt-gtcatgctcg-teaggggggc-ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 10020
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 10080
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga 10140
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 10200
aaccgcctct cccgcgcgtt tgcccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg 10260
actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac 10320
cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttggtg tggaattgtg agcggataac 10380
aatttcacac aggaacagc tatgaccatg attacgaatt tcgacctgca ggcattgcaag 10440
cttgcattgc tgcaggtcga cgtcgcgcgc acttggtttg ccattcttta gcgcgcgtcg 10500
cgtcacacag cttggccaca at 10522

```

<210> 22
 <211> 11867
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA1188

<400> 22

```

gtgggtttttg tcaaacgaag attctatgac gtgttttaaag tttagggtcga gtaaagcgca      60
aatcttttttt aacctagaa agatagtctg cgtaaaattg acgcatgcat tcttgaaata      120
ttgctctcttc tttctaaata gcgcgaatcc gtgcgtgtgc atttaggaca tctcagtcgc      180
cgcttggagc tcccgtagg cggtgctgtc aatgcggtaa gtgtcactga ttttgaacta      240
taacgaccgc gtgagtcaaa atgacgcacg attatctttt acgtgacttt taagatttaa      300
ctcatacgat aattatattg ttatttcatg ttctacttac gtgataactt attatatata      360
tattttctttg ttatagatat cgtgactaat atataataaa atgggtagtt ctttagacga      420
tgagcatatc ctctctgctc ttctgcaaag cgatgacgag cttgttggtg aggattctga      480
cagtgaataa tcagatcacg taagtgaaga tgacgtccag agcgatacag aagaagcggt      540
tatagatgag gtacatgaag tgcagccaac gtcaagcggg agtgaaatat tagacgaaca      600
aaatgttatt gaacaaccag gttcttcatt ggcttctaac agaactctga ccttgccaca      660
gaggactatt agaggtaaga ataaacattg ttggtcaact tcaaagtcca cgaggcgtag      720
ccgagtctct gcaactgaaca ttgtcagatc ggcccggggc ccgtttttct tgaaatattg      780
ctctctcttt ctaaatagcg cgaatccgtc gctgtgcatt taggacatct cagtcgccgc      840
ttggagctcc caaacgcgcc agtggttagta cacagtactg tgggtgttca gtttgaaatc      900
ctcttgcttc tccattgtct cggttacett tgggtcaaac catgggttct attgcctata      960
tactcttgcg attaccagtg attgcgctat tagctattag atggattggt ggccaaactt     1020
gtcgcttaag tggctgggaa ttgtaaccgt aggcccgagt gtaatgatcc cccataaaaa     1080
-gttttcgcaa tgcctttatt_ttttggtgca aatctctctt tattctgcgg tattcttcat     1140
tattgcgggg atggggaaag tgtttatata gaagcaactt acgattgaac ccaaatgcac     1200
ctgacaagca aggtcaaagg gccagatctt taaatatatt atttagtctt aggactctct     1260
atttgcaatt aaattacttt gctacctgag gggttaaact tccccattga taataataat     1320
tccactatat gttcaattgg gtttcacogc gcttagttac atgacgagcc ctaatgagcc     1380
gtcgggtggtc tataaactgt gccttcaaaa tacttgcaac tcttctcgtt ttgaagtcag     1440
cagagttatt gctaattgct aattgctaatt tgcctttaac tgattttcttc gaaattgggtg     1500
ctatgtttat ggcgtatta acaagtatga atgtcagggt taaccagggg atgcttaatt     1560
gtgttctcaa cttcaaaggc agaaatgttt actcttgacc atgggttttag gtataatggt     1620
atcaagctcc tcgagttaac gttacgttaa cggttaacgtt cgagggtcgac tctagaacta     1680
cccaccgtac tcgtcaattc caagggcatc ggtaaacatc tgcctaaact cgaagtcggc     1740
catatccaga gcgcgtagg gggcggtggtc gtggggggta aatcccgga cgggggaatc     1800
cccgcccccc aacatgtcca gatcgaaatc gtctagcgcg tcggcatgcg ccatcgccac     1860
gtcctcgccg tctaagtga gctcgtcccc caggctgaca tcggtcgggg gggccgtcga     1920

```

cagtctgcgc gtgtgtcccg cggggagaaa ggacaggcgc ggagccgcc accccgcctc 1980
 ttccgggggcg tcgtcgtccg ggagatcgag caggccctcg atggtagacc cgtaattggt 2040
 tttcgtacgc gcgcggctgt acgcggggcc cgagcccgac tcgcatttca gttgcttttc 2100
 caatccgcag ataatcagct ccaagccgaa caggaatgcc ggctcggtc cttgatgac 2160
 gaacagctcg attgcctgac gcagcagtgg gggcatcgaa tcggttggtg gggctctcg 2220
 ctctcttttt ggcacttgat gctcttggtc ctccagcacg cagcccaggg taaagtgacc 2280
 gacggcgctc agagcgtaga gagcattttc caggctgaag ccttgctggc acaggaacgc 2340
 gagctgggtc tccagtgtct cgtattgctt ttccggtcggg cgcgtgccga gatggacttt 2400
 ggcaccgtct cgggtgggaca gcagagcgca gcggaacgac ttggcgttat tgcggaggaa 2460
 gtctgcccag gactgcctt ccaacgggca aaaatgcgtg tgggtggcggc cgagcatctc 2520
 gatggccagg gcatccagca gcgcccgtt attcttcacc tatagatacc atagatgtat 2580
 ggattagtat catatacata caaaggctat ttttgggaca tattaatatt aacaatttcc 2640
 gtgatagttt tcaccatttt tgttgaatgt tacgttgaaa atttaaattt gttttaaatt 2700
 aattttacca gtcagtgtt cttaaaagt tttatgattg aaacggcata aagtgggtca 2760
 aaaatttacc aagaaaggct ttctttttt aaatcttacc ttttctctt aaaaatcact 2820
 agtcaattca ttattaattt gttaacttga atttggatg tctatttact ttcagataaa 2880
 ttaaagcaag aaacttaata ttcgaaaaaa attgattcta aatggaattt cacttgatct 2940
 tcatgtatgc atatcaattt ttattttacat tgtataataa gtttcgagtt gattgttgta 3000
 atccacaggt gtcccagaga attaaattcc aaattaccca agtttattga atgttgattg 3060
 tagtttcagt tgccttggtg ctgcaacaat ggcttggtga ttgtagatat tttcccttcc 3120
 cttgggtttac ttattacata gactgaaaaa gaggtttact ttttgatac ttatgaaaaa 3180
 tttctattag tgattactaa ccaatcgcta tatgtttact agaaaacaaa taaactcttt 3240
 acattaacat tcaataatgt ttgctctgta accgacaatt gaaggcgta cagcaacagt 3300
 aatataacta gcttcttaac cctcatctat taaccccatc gtttaaaaca ctatgttaaa 3360
 tgggtctaaca aatctagata ctaatagatg tcttattact tagcagccac agctgcaaca 3420
 tocaagacaa tttttgaaac ttcttattga gctcttgga gcagaaatgt tggatttttt 3480
 cacagctttc tgaaagaccg gcaacctcct ccggttcccg tttctgaatt caagaggatt 3540
 tccgaccccc aattaatccc gaaacaaata aggtatatcc aaaatgatgg aaaagtcacg 3600
 gctgctgacc ttatttttat tcctattgat agaattattat tcccccttta aatacactgt 3660
 actaagaggt ccggctataa ttttactcac ttgtogatta tcccatagaa tgttgattgt 3720
 agttgggtgc ttttccaggt gagagttgat caagtcacaa aagttagcgt gtgttgattg 3780
 tagatttgaa ggtaaaataa tttttgcacc cattcatcgg gtaaaacggt ctccatagaa 3840
 tacatttcca tcgataattg ataacttatg aatttcaaag aaaaaaatat gcttttaaaa 3900

ttacgtgccg gtagaggggtg ggctgtccca cgtccagctt ctgcgccaac ttgcgggtcg 3960
 tcagtccttc aatgccaaact tcgttcaaca gtcaccaacgc ggagttgatg actttggact 4020
 tatccaggcg gctgcccattg gtggtttcta aagggtgttat aaatcaaatt agttttgttt 4080
 tttcttgaaa actttgcgtt tcctttgatc aacttaccgc cagggtaccg cagattgttt 4140
 agcttggtca gctgcgcttg tttatttgct tagctttcgc ttagcgacgt gttcactttg 4200
 cttgtttgaa ttgaattgtc gctccgtaga cgaagcgctt ctatttatac tccggcgctc 4260
 gttttcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact 4320
 ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca ctccctatca gtgatagaga 4380
 aaagtgaag tcgagtttac cactccctat cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt 4440
 accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga 4500
 tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc 4560
 gaaacctggc gcgccccggc catcgagaaa gagagagaga agagaagaga gagaacattc 4620
 gagaaagaga gagagaagag aagagagaga acatactccc tatcagtgat agagaagtcc 4680
 ctatcagtga tagagatgtc cctatcagt atagagagtc ccctatcagt gatagagacg 4740
 tccctatcag tgatagagaa gtccctatca gtgatagaga gatccctatc agtgatagag 4800
 atttccctat cagtgataga gaggtcccta tcagtgatag agacttccct atcagtgata 4860
 gagaaatccc tatcagtgat agagacatcc ctatcagtga tagagaactc cctatcagtg 4920
 atagagacct ccctatcagt gatagagatc gatgcggccg catggtacct attgcttgtc 4980
 atttattaat ttggatgatg tcatttggtt ttaaaattga actggcttta cgagtagaat 5040
 tctacgcgta .aaacacaatc .aagtatgagt cataatctga tgtcatgttt tgtacacggc 5100
 tcataaccga actggcttta cgagtagaat tctacttgta atgcacgac agtggatgat 5160
 gtcatttggt tttcaaactg agatgatgtc atgttttgca cacggctcat aaactcgctt 5220
 tacgagtaga attctacgtg taacgcacga tcgattgatg agtcatttgt tttgcaatat 5280
 gatatacatc aatatgactc atttggtttt caaaaccgaa cttgatttac gggtagaatt 5340
 ctacttgtaa agcacaatca aaaagatgat gtcatttggt tttcaaaact gaactcgctt 5400
 tacgagtaga attctacgtg taaaacacaa tcaagaaatg atgtcatttg ttataaaaaat 5460
 aaaagctgat gtcattgttt gcacatggct cataactaaa ctgcctttac gggtagaatt 5520
 ctacgcgtaa aacatgattg ataattaaat aattcatttg caagctatac gtaaatcaa 5580
 .acggacgctc .gaggttgac aacactatta tcgatttgca gttcgggaca taaatgttta 5640
 aatataatga tgtctttgtg atgcgcgcga ctttttgta gggtattgat aaaatgaacg 5700
 gatacgttgc ccgacattat cattaaatcc ttggcgtaga atttgcggg tccattgtcc 5760
 gtgtgcgcta gcatgccgtt aacggacctc gtacttttgg ctcaaagggt tttgcgcaca 5820
 gacaaaatgt gccacacttg cagctctgca tgtgtgcgcg ttaccacaaa tcccaacggc 5880

gcagtgtact tgttgtatgc aaataaatct cgataaagge gcggcgcgcg aatgcagctg 5940
 atcacgtacg ctctctgtgt tccgttcaag gacgggtgta tcgacctcag attaattgtt 6000
 atcggccgac tgttttcgta tccgctcacc aaacgcgttt ttgcattaac attgtatgtc 6060
 ggcggatgtt ctatatctaa tttgaataaa taaacgataa ccgcggttggg tttagagggc 6120
 ataataaaag aaatattgtt atcgtgttcg ccattagggc agtataaatt gacgttcattg 6180
 ttggatattg tttcagttgc aagttgacac tggcggcgac aagcaattct aattggggta 6240
 agttttcccg ttctttctg ggttcttccc ttttgcctat ccttgctgca ctaccttcag 6300
 gtgcaagttg agattcaggc caccatggga gatcccaccc caccgaagaa gaagcgcaaa 6360
 ccggtcgcca ccattggcctc ctccgagaac gtcattaccg agttcatgcg cttcaagggtg 6420
 cgcattggagg gcacctgaa cggccacgag ttccgagatcg agggcgaggg cgagggcgcg 6480
 ccctacgagg gccacaacac cgtgaagctg aaggtgacca agggcgggcc cctgcccttc 6540
 gcctgggaca tctgttcccc ccagttccag tacggctcca aggtgtacgt gaagcaccct 6600
 gccgacatcc ccgactacaa gaagctgtcc ttccccgagg gcttcaagtg ggagcgcggtg 6660
 atgaacttcg aggacggcgg cgtggcgacc gtgaccagg actcctccct gcaggacggc 6720
 tgcttcatct acaagggtgaa gttcatcggc gtgaacttcc cctccgacgg ccccggtgatg 6780
 cagaagaaga ccattgggctg ggaggcctcc accgagcgcc tgtacccccg cgacggcggtg 6840
 ctgaagggcg agaccacaaa ggcctgaag ctgaaggacg gcggccacta cctgggtggag 6900
 ttcaagtcca tctacatggc caagaagccc gtgcagctgc ccggctacta ctacgtggac 6960
 gccaaagctg acatcacctc ccacaacgag gactacacca tcgtggagca gtacgagcgc 7020
 _accgagggcc_gccaccacct gttcctgaga tctcgacca agaaaaagcg gaaggtggag 7080
 gaccctgaag atccaccgga tctagataac tgatcataat cagccatacc acattttag 7140
 aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaatga 7200
 atgcaattgt tgtgttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 7260
 gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt ttctactgca ttctagttgt ggtttgccta 7320
 aactcatcaa tgtatcttaa cgcgagttaa ttaaggccgc tcatttaaat ctggccggcc 7380
 gcaaccattg tgggaaccgt gcgatcaaac aaacgcgaga tacgggaagt actgaaaaac 7440
 agtcgctcca ggccagtggg aacatcgatg ttttgttttg acggaccct tactctcgtc 7500
 tcatataaac cgaagccagc taagatggta tacttattat catcttgtga tgaggatgct 7560
 tctatcaacg aaagtaccgg taaaccgcaa atggttatgt attataatca aactaaaggc --7620
 ggagtggaca cgctagacca aatgtgttct gtgatgacct gcagtaggaa gacgaatagg 7680
 tggcctatgg cattattgta cggaatgata aacattgcct gcataaatte ttttattata 7740
 tacagccata atgtcagtag caaggagaa aaggtccaaa gtcgcaaaaa atttatgaga 7800
 aacctttaca tgagcctgac gtcattcgtt atgcgtaagc gtttagaagc tctactttg 7860

aagagatatt tgcgcgataa tatctctaata attttgccaa atgaagtgcc tggtagatca 7920
gatgacagta ctgaagagcc agtaatgaaa aaacgtactt actgtactta ctgccccctct 7980
aaaataaggc gaaaggcaaa tgcacgtgc aaaaaatgca aaaaagtat ttgtcgagag 8040
cataatattg atatgtgcc aagtgtttc tgactgacta ataagtataa tttgtttcta 8100
ttatgtataa gttaagctaa ttacttattt tataatacaa catgactgtt tttaaagtac 8160
aaaataagtt tttttttgta aaagagagaa tgtttaaaag tttgttact ttatagaaga 8220
aattttgagt tttgttttt ttttaataaa taaataaaca taaataaatt gtttgttgaa 8280
tttattatta gtatgtaagt gtaaataata taaaacttaa tatctattca aattaataaa 8340
taaacctcga tatacagacc gataaaacac atgcgtcaat tttacgcatg attatcttta 8400
acgtacgtca caatatgatt atctttctag ggtaaataa tagtttctaa tttttttatt 8460
attcagcctg ctgtcgtgaa taccgtatat ctcaacgctg tctgtgagat tgtcgtattc 8520
tagccttttt agttttctgc tcatcgactt gatattgtcc gacacatttt cgtcgatttg 8580
cgttttgatc aaagacttga gcagagacac gttaatcaac tgttcaaatt gatccatatt 8640
aacgatatca acccgatgcg tatatggtgc gtaaaatata ttttttaacc ctcttatact 8700
ttgcactctg cgtaataacg cgttcgtgta cagacgtaat catgttttct tttttggata 8760
aaactcctac tgagtttgac ctcatattag accctcaciaa gttgcaaac gtggcatttt 8820
ttaccaatga agaattttaa gttattttta aaaatttcat cacagattta aagaagaacc 8880
aaaaattaaa ttatttcaac agtttaatcg accagttaat caacgtgtac acagacgcgt 8940
cggcaaaaaa cagcagccc gacgtgttg ctaaaattat taaatcaact tgtgttatag 9000
tcacggattt gcggtccaac gtgttctca aaaagttgaa gaccaacaag tttacggaca 9060
ctattaatta tttgattttg cccacttca tttgtggga tcacaatttt gttatatttt 9120
aaacaaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt 9180
acccaactta atgccttgc agcacatccc ctttccgcca gctggcgtaa tagcgaagag 9240
gcccgcaccg atgccttcc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg 9300
cgggtatttt tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatatggtg cactctcagt 9360
acaatctgct ctgatgcgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac 9420
gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gacgtctcc 9480
gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc 9540
ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat gtcattgataa taatggtttc ttagacgtca 9600
ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt cttaatacat 9660
tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa tgcctcaata atattgaaaa 9720
aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtgccttca tccctttttt tgcggcattt 9780
tgcttctctg tttttgtca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 9840

ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt 9900
 ttctgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg 9960
 gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 10020
 aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 10080
 agagaattat gcagtgtgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg 10140
 acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta 10200
 actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 10260
 accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 10320
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 10380
 cttctgcgct cgcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 10440
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 10500
 gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag 10560
 ataggtgct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 10620
 tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 10680
 aatctcatga ccaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 10740
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 10800
 aaaaaaaaaac caccgtacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 10860
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 10920
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgtctgcta 10980
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 11040
 agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag 11100
 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa 11160
 agcggcacgc tttccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cggtaagcgg cagggtcgga 11220
 acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc 11280
 gggtttgcgc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 11340
 ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 11400
 gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 11460
 gagtgagctg ataccgctcg ccgcagcga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 11520
 gaagcggaag agcgccaat acgcaaaceg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 11580
 tgcagctggc acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 11640
 gtgagttagc tctctatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 11700
 ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccattgattac 11760
 gaatttcgac ctgcaggcat gcaagcttgc atgcctgcag gtcgacgctc gcgcgacttg 11820

gtttgccatt ctttagcgcg cgtcgcgtca cacagcttgg ccacaat 11867

<210> 23
 <211> 10786
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> pLA670

<400> 23

5

10

ggccgctcat ttaaattctgg cggccgcaa ccattgtggg aaccgtgcca tcaaacaaac 60

gcgagatacc ggaagtactg aaaaacagtc gctccaggcc agtgggaaca tcgatgtttt 120

gttttgacgg accccttact ctgcgtctcat ataaaccgaa gccagctaag atggtatact 180

tattatcatc ttgtgatgag gatgcttcta tcaacgaaag taccggtaaa ccgcaaattg 240

ttatgtatta taatcaaact aaaggcggag tggacacgct agaccaaattg tgttctgtga 300

tgacctgcag taggaagacg aataggtggc ctatggcatt attgtacgga atgataaaca 360

ttgcctgcat aaattctttt attatataca gccataatgt cagtagcaag ggagaaaagg 420

tccaaagtgc caaaaaattt atgagaaacc ttacatgag cctgacgtca tcgtttatgc 480

gtaagcgttt agaagctcct actttgaaga gatatttgcg cgataaatatc tctaataattt 540

tgccaaatga agtgccctgg acatcagatg acagtactga agagccagta atgaaaaaac 600

gtacttactg tacttactgc cctctaaaa taaggcgaaa ggcaaatgca tcgtgcaaaa 660

aatgcaaaaa agttatttgt cgagagcata atattgatat gtgccaaagt tgtttctgac 720

tgactaataa gtataatttg tttctattat gtataagtta agctaattac ttattttata 780

--atacaacatg _actgttttta _aagtacaaaa taagtattt tttgtaaaag agagaatggt 840

taaaagtttt gttactttat agaagaaatt ttgagttttt gttttttttt aataaataaa 900

taaacataaa taaattgttt gttgaattta ttattagtat gtaagtgtaa atataataaa 960

acttaatatc tattcaaatt aataaataaa cctcgatata cagaccgata aaacacatgc 1020

gtcaatttta cgcattgatta tctttaacgt acgtcacaaat atgattatct ttctaggggt 1080

aaataantag ttctaatttt tttattatc agcctgctgt cgtgaatacc gtatatctca 1140

acgctgtctg tgagattgtc gtattctagc ctttttagtt tttcgctcat cgacttgata 1200

ttgtccgaca cattttcgtc gatttgcgtt ttgatcaaag acttgagcag agacacgtta 1260

atcaactggt caaattgatc catattaacg atatcaacc gatgcgtata tgggtgcgtaa 1320

aatatatttt ttaaccctct tatactttgc actctgcgtt aatacgcgtt cgtgtacaga 1380

cgtaatcatg ttttcttttt tggataaaac tcctactgag tttgacctca tattagacct 1440

tcacaagttg caaaacgtgg cattttttac caatgaagaa tttaaagtt ttttaaaaaa 1500

tttcatcaca gatttaaaga agaaccaaaa attaaattat ttcaacagtt taatcgacca 1560

gttaatcaac gtgtacacag acgcgtcggc aaaaaacacg cagcccgacg tgttggctaa 1620

aattattaaa tcaacttggt ttatagtcac ggatttgccg tccaacgtgt tccataaaaa 1680
gttgaagacc aacaagttta cggacactat taattatttg attttgcccc acttcatttt 1740
gtgggatcac aattttgtta tattttaaac aaagcttggc actggccgtc gttttacaac 1800
gtcgtgactg ggaaaaacct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgacgca cateccccct 1860
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccctcccaa cagttgcgca 1920
gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcacctg tgcggtattt 1980
cacaccgat atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc 2040
cccgacaccc gccaacaccc gctgaacgac cctgaacggc ttgtctgctc ccggcatccg 2100
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat 2160
caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatacgcc atttttatag gttaatgtca 2220
tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc 2280
ctatttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 2340
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 2400
cccttattcc cttttttgcg gcattttgac ttccgtgttt tgctcaccca gaaacgctgg 2460
tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 2520
tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca 2580
cttttaaggt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac 2640
tcggtcgccc catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa 2700
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 2760
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 2820
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 2880
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 2940
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 3000
tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggtt ggctggttta 3060
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggc tatcattgca gcactggggc 3120
cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 3180
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 3240
cagaccaagt ttactcatat taactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 3300
ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 3360
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 3420
ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt 3480
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 3540
taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 3600

caccgcctac atacctcgct ctgctaatacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 3660
agtctgtgct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcgggtcgg 3720
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga 3780
gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3840
ggatatccggg aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 3900
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt 3960
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 4020
ggttcctggc cttttgctgg ctttttgcgc acatgttctt tctgctgta tccctgatt 4080
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 4140
ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggagagcgc cccaatacgc aaaccgcctc 4200
tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaaag 4260
cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccagggctt 4320
tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 4380
caggaaacag ctatgacct gattacgaat ttccacctgc aggcattgcaa gcttgcattgc 4440
ctgcaggctc acgctcgccg gacttggttt gccattcttt agcgcgcgctc gcgtcacaca 4500
gcttggccac aatgtgggtt ttgtcaaacg aagattctat gacgtgttta aagttaggt 4560
cgagtaaage gcaaatcttt ttaaaccta gaaagatagt ctgcgtaaaa ttgacgcattg 4620
cattcttgaa atattgctct ctctttctaa atagcgcgaa tccgtcgctg tgcatttagg 4680
acatctcagt cgcgcgttgg agctcccgtg aggcgtgctt gtcaatgcgg taagtgtcac 4740
tgattttgaa ctataacgac cgcgtagctc aaagtgcgc atgattatct ttacgtgac 4800
ttttaagatt taactcatac gataattata ttgttatctc atgttctact tacgtgataa 4860
cttattatat atataatttc ttgttataga tctcgtgact aatatataat aaaatgggta 4920
gttctttaga cgatgagcat atcctctctg ctcttctgca aagcgatgac gagcttgttg 4980
gtgaggattc tgacagtga atacagatc acgtaagtga agatgacgctc cagagcgata 5040
cagaagaagc gtttatagat gaggtacatg aagtgcagcc aacgtcaagc ggtagtgaaa 5100
tattagacga acaaaatgtt attgaacaac caggttcttc attggcttct aacagaatct 5160
tgacottgcc acagaggact attagaggta agaataaaca ttgttgggtc acttcaaagt 5220
ccacgaggcg tagccgagtc tctgcactga acattgtcag atcgcccgcg gcgcggtttt 5280
tcttgaaata ttgctctctc tttctaaata gcgcgaatcc gtcgctgtgc atttaggaca 5340
tctcagtcgc cgcttgagc tcccaaacgc gccagtggtg gtacacagta ctgtgggtgt 5400
tcagtttgaa atcctcttgc ttctccattg tctcggttac ctttgggtcaa atccatgggt 5460
tctattgctt atatactctt gcgattacca gtgattgcgc tattagctat tagatggatt 5520
gttggccaaa cttgtcgctt aagtggctgg gaattgtaac cgtaggcccg agtgtaatga 5580

tcccccataa aaagttttcg caatgccttt attttttgtt gcaaactctct ctttattctg 5640
 cggatattctt cattattgctg gggatgggga aagtgtttat atagaagcaa cttacgattg 5700
 aacccaaatg cacctgacaa gcaagggtcaa agggccagat ttttaaatac attatttagt 5760
 cttaggactc tctatttgca attaaattac tttgctacct gaggggttaa tcttccccat 5820
 tgataataat aattccacta tatgttcaat tgggtttcac cgcgcttagt tacatgacga 5880
 gccctaataa gccgtcgggtg gtctataaac tgtgccttac aaatacttgc aactcttctc 5940
 gttttgaagt cagcagagtt attgctaatt gctaattgct aattgctttt aactgatttc 6000
 ttcgaaattg gtgctatgtt tatggcgcta ttaacaagta tgaatgtcag gtttaaccag 6060
 gggatgctta attgtgttct caacttcaaa ggcagaaatg tttactcttg accatgggtt 6120
 taggtataat gttatcaagc tcttcgagtt aacgttacgt taacgttaac gttcagagtc 6180
 gactotagaa ctaccaccg tactcgtcaa ttccaagggc atcggtaaac atctgctcaa 6240
 actcgaagtc ggccatatcc agagcgccgt agggggcgga gtctgtgggg gtaaattccc 6300
 gaccggggga atccccgtcc cccaacatgt ccagatcgaa atcgtctagc gcgtcggcat 6360
 gcgccatcgc cactcctcg ccgtctaagt ggagctcgtc cccagggctg acatcggtcg 6420
 gggggggcgt cgacagtctg cgcgtgtgtc ccgcggggag aaaggacagg cgcggagccg 6480
 ccagccccgc ctcttcgggg gcgtcgtcgt ccgggagatc gagcaggccc tcgatggtag 6540
 acccgtaatt gtttttcgta cgcgcgcggc tgtacgcggg gcccgagccc gactcgcatt 6600
 tcagttgctt ttccaatccg cagataatca gttccaagcc gaacaggaat gccggctcgg 6660
 ctcttgatg atcgaacagc tcgattgcct gacgcagcag tgggggcacg gaatcggttg 6720
 ttggggctc_gcgctcctct...tttgcgactt_gatgctcttg_gtcctccagc acgcagccca 6780
 gggtaaagtg accgacggcg ctcagagcgt agagagcatt ttccaggctg aagccttgct 6840
 ggcacaggaa cgcgagctgg ttctccagtg tctcgtattg cttttcggtc gggcgctgc 6900
 cgagatggac tttggcaccg tctcgggtgg acagcagagc gcagcggaac gacttggcgt 6960
 tattgaggag gaagtccctg caggactcgc cttccaacgg gcaaaaatgc gtgtggtggc 7020
 ggtcagagat ctogatggcc agggcatcca gcagcgccc cttattcttc acgtgccagt 7080
 agagggtggg ctgctccacg ccagcttct gcgccaactt gcgggtcgtc agtccctcaa 7140
 tgccaacttc gttcaacagc tccaacggcg agttgatgac tttggactta tccaggcggc 7200
 tgcccatggt ggtttctaaa ggtgttataa atcaaattag ttttgtttt tcttgaaaac 7260
 tttgcgtttc ctttgatcaa-cttaccgcca-gggtaccgca gattgttttag cttgttcagc 7320
 tgcgcttggt tatttgctta gctttcgtt agcgcaggtg tcaactttgct tgtttgaatt 7380
 gaattgtcgc tccgtagacg aagcgctctc atttatactc cggcgctcgt tttcaggttt 7440
 accactccct atcagtata gagaaaagtg aaagtcagat ttaccactcc ctatcagtga 7500
 tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc 7560

gagtttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tgcagtttac cactccctat	7620
cagtgataga gaaaagtga agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg	7680
aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga aacctggcgc	7740
gcctcttaat taactcgcgt taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat	7800
gcagtgaaaa aaatgcttta ttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat	7860
tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcagggttca	7920
gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gstatggctga	7980
ttatgatcag ttatctagat ccggtggatc ttacgggtcc tccaccttcc gctttttctt	8040
gggtcgagat ctcaggaaca ggtggtggcg gccctcggtg cgctcgtact gctccacgat	8100
ggtgtagtcc tcgttgtggg aggtgatgtc cagcttggcg tccacgtagt agtagccggg	8160
cagctgcacg ggcttcttgg ccatgtagat ggacttgaac tccaccaggt agtggccgcc	8220
gtccttcagc ttcagggcct tgtgggtctc gcccttcagc acgccgtcgc gggggtacag	8280
gcgctcggtg gaggcctccc agcccatggg cttcttctgc atcacggggc cgtcggaggg	8340
gaagttcacg ccgatgaact tcaccttgta gatgaagcag ccgtcctgca gggaggagtc	8400
ctgggtcacg gtcgccacgc cgcgcctc gaagttcatc acgcgcctcc acttgaagcc	8460
ctcggggaag gacagcttct tgtagtcggg gatgtcggcg ggggtgcttca cgtacacctt	8520
ggagccgtac tggaaactggg gggacaggat gtcccaggcg aagggcaggg ggcgcctt	8580
ggtcaccttc agcttcacgg tgttgtggcc ctcgtagggg cgccctcgc cctcgcctc	8640
gatctogaac tcgtggccgt tcacggtgcc ctccatgccc accttgaagc gcatgaactc	8700
gggtgatgacg ttctcggagg aggccatggg ggcgaccggg ttgcgcttct tcttgggtgg	8760
ggtgggatcc ccgatctgca ttttggatta ttctgcggt caaaatagag atgtgaaaa	8820
ttagtacgaa atcaaatgag ttctggtgaa attacaaaac tattgaaact aacttcttgg	8880
ctggggaata aaaatgggaa acttatttat cgacgccaac ttgttgaga aaccttatt	8940
aacctctac gaatattgga acaaaggaaa gcgaagaac aggaacaaag gtagttgaga	9000
aacctgttcc gttgctcgtc atcgttttca taatgcgagt gtgtgcatgt atatatacac	9060
agctgaaacg catgcataca cattattttg tgtgtatatg gtgacgtcac aactactaag	9120
caataagaaa ttttccagac gtggctttcg tttcaagcaa cctactctat ttcagctaaa	9180
aataagtgga ttctgttggg aaaatacttc aattaagcaa agaactaact aactaataac	9240
atgcacacaa atgctcgagt gcgttcgtga tttctcgaat tttcaaatgc gtcactgcga	9300
atttcacaat ttgccataa atcttggcg aaatcaacac gcaagtttta tttatagatt	9360
tgtttgcgtt ttgatgccaa ttgattggga aaacaagatg cgtggctgcc aatttcttat	9420
tttgtaatga cgtagagcgt tgaataaaaa aaaaatggcc gaacaaagac cttgaaatgc	9480
agtttttctt gaaattactc aacgtcttgt tgctcttatt actaattggg aacagcgagt	9540

taaaaactta cgtttcttgt gactttcgag aatgttcttt taattgtact ttaatcacca 9600
acaattaagt ataaattttt cgctgattgc gctttacttt ctgcttgtag ttgctgctgc 9660
aatgtcaat tggttttgaa ggcgaccgtt cgcgaacgct gtttatatac cttcgggtgc 9720
cgttgaaaat cactaaaaaa taccgtagtg ttogtaacac tttagtagag agaaaaaaaa 9780
ttgtgccgaa atgtttttga tacgtacgaa taccttgtat taaaattttt tatgatttct 9840
gtgtatcact ttttttttgc gtttttcgtt taaactcacc acagtacaaa acaataaaat 9900
atttttaaga caatttcaaa ttgagacctt tctcgtagtg acttgaccgg ctgaatgagg 9960
atctctacct agacgacctt cttcttacca tgacattgaa tgcaatgcc a ctttgatct 10020
aaacttacaa aagtcgaagg cttgttagga ttggtgttta tttagtttgc ttttgaaata 10080
gcactgtctt ctctaccggc tataattttg aaactcgcag cttgactgga aatttaaaaa 10140
gtaattctgt gtaggtaaag ggtgttttaa aagtgtgatg tgttgagcgt tgcggcaacg 10200
actgctatct atgtatatat tttcaaaact tattgttttt gaagtgtttt aaatggagct 10260
atctggcaac gctgcgcata atcttacaca agcttttctt aatccatttt taagtgaat 10320
ttgtttttac tctttcggca aataattgtt aaatcgcttt aagtgggctt acatctggat 10380
aagtaatgaa aacctgcata ttataatatt aaaacatata atccactgtg ctttccccgt 10440
gtgtggccat atacctaaaa aagtttattt tcgcagagcc cgcacgggc acactacggg 10500
tcggcgattt tcgatttttg acagtactga ttgcaagcg accgaaagca aaatggagct 10560
ggagattttg aaocggaaga acagcaagcc gtacggcaag gtgaagggtg cctccggcgc 10620
cacgcccac gcgcatctgc gcgcctaata tcacaagacc ctgaagcaga cccacacgc 10680
_gaatcgccag_tcgcttcgtc_tggaaactgaa_gggcaaaagc ctgaaagata cggacacatt 10740
ggaatctctg tcgctgcgtt ccggcgacaa gatcggggta ccatgc 10786

<210> 24
<211> 14720
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> pLA1038

<400> 24

gggctatggc gcgccggacg cggcaagtct gcgagcttat atttacgtgg atctccgggtg 60
tgtccatgat tcggcatcat atcataaacg acgaattcca ataaaaactt tgcttgttga 120
taacacctga tgttcagaga tgcccagataa aatcacagct gttctgggtc acagtaccca 180
gaaataaaaa atattggaat tgagatgtac acaattaacg atatttataa atatcttcog 240
atagtctatc gtccgggtta tcaaaataaa gtgcgacgaa ttaacatatt ttcaaaatta 300
agacgctttg atagatgtat ttgtatagag atagaaatta aggttaaaat aacataaatg 360
ccaaagttta gagcactatt caataattct cttgatttca aattgaaata atacacaata 420

taacattttc taacactaca aagtcacgat attcttccac caaccgatag tatcgcacac	480
ttgccattcg cctcatcacg cacacgcccg cttcacaatt caaacgaacg gcattttatt	540
ttcacaggat cccgggagtc gtgaatgttt tacccaatat cgactttcat tgttaactga	600
ccaaaattgt aatctgttct gttagttgtc gagtgcctgt gccgcgatcg ctatgggcat	660
atgttgccaa actctaaacc aaatactcat tctgatgttt taaatgattt gccctcccat	720
atgtccttcc gagtgcagaga cacaaaaaat tccaacacac tattgcaatg aaaataaatt	780
tcctttatta gccagaagtc agatgctcaa ggggcttcat gatgtcccca taatttttgg	840
cagagggaaa aagatctcag tggatattgt gagccagggc attggccaca ccagccacca	900
ccttctgata ggcagcctgc acctgaggag tgaattcttt gccaaaatga tgagacagca	960
caacaaccag cacgttgccc aggagctgta ggaaagagaa gaaggcatga acatgggttag	1020
cagagggggc cggtttgac tcagagtatt ttatcctcat ctcaaacagt gtatatcatt	1080
gtaaccataa agagaaaggc aggatgatga ccaggggtga gttgtttcta ccaataagaa	1140
tatttccacg ccagccagaa tttatatgca gaaatattct accttatcat ttaattataa	1200
caattgttct ctaaaactgt gctgaagtac aatataatat acctgattg ccttgaaaaa	1260
aaagtgatta gagaaagtac ttacaatctg acaataaac aaaagtgaat ttaaaaattc	1320
gttacaatg caagctaaag tttaacgaaa aagttacaga aaatgaaaag aaaataagag	1380
gagacaatgg ttgtcaacag agtagaaagt gaaagaaaca aaattatcat gaggggtccat	1440
ggtgatacaa gggacattct cccattctaa acaacacct gaaaactttg cccctccat	1500
ataacatgaa ttttacaata gcgaaaaaga aagaacaatc aagggtcccc aaactcacc	1560
tgaagtctc agctctagac gcgtttcact acccaccgta ctctcaatt ccaagggcat	1620
cggtaaacad ctgctcaaac tcgaagtcgg ccatatccag agcgcgtag ggggcggagt	1680
cgtggggggg aaatcccga cccggggaat ccccgcccc caacatgtcc agatcgaat	1740
cgtctagcgc gtcggcatgc gccatcgcca cgtcctcgcc gtctaagtgg agctcgtccc	1800
ccaggctgac atcggtcggg ggggcgctcg acagtctgag cgtgtgtccc gcggggagaa	1860
aggacaggcg cggagccgcc agccccgct cttcgggggc gtcgtcgtcc gggagatcga	1920
gcaggccctc gatggtagac ccgtaattgt ttttcgtacg cgcgcggctg tacgcggacc	1980
cactttcaca ttttaagttgt ttttctaata cgcatatgat caattcaagg ccgaataaga	2040
aggctggctc tgcaccttg tgatcaaata attcgatagc ttgtcgtaat aatggcggca	2100
tactatcagt agtaggtgtt tccctttctt ctttagcgac ttgatgctct tgatcttcca	2160
atacgcaacc taaagtaaaa tgccccacag cgctgagtcg atataatgca ttctctagt	2220
aaaaaccttg ttggcataaa aaggctaatt gattttcgag agtttcatac tgttttctg	2280
taggcgctgt acctaaatgt acttttgctc catcgcgatg acttagtaaa gcacatctaa	2340
aacttttagc gttattacgt aaaaaatctt gccagcttcc ccttctaaa gggcaaaagt	2400

gagtatggtg cctatctaac atctcaatgg ctaaggcgtc gagcaaagcc cgcttatttt 2460
 ttacatgcc aatacatgta ggctgctcta cactagctt ctgggcgagt ttacgggttg 2520
 ttaaaccctt gattccgacc tcattaagca gctctaattgc gctgttaatc actttacttt 2580
 tatctaattc caattccatg gtggcaacct gcaaggcgaa tgaataaaca agattgtggc 2640
 gaacagtgt aatgcgaaga cccacctctg ctccaattcc caattcccta ttcagctcga 2700
 ggggggatcc cggggtaccg agctcgaatt cggggccgag gaggtcggat cgggtccggt 2760
 gtcttctatg gaggtcaaaa cagcgtggat gggtctcca ggcgatctga cggttcacta 2820
 aacgagctct gcttatatag gcctcccacc gtacacgctt acctcgacct gggtagcgag 2880
 ctgactttt acttttctct atcactgata gggagtggta aactcgactt tcacttttct 2940
 ctatcactga tagggagtgg taaactcgac tttcactttt ctctatcact gatagggagt 3000
 ggtaaacctg actttcactt ttctctatca ctgataggga gtggtaaac cgactttcac 3060
 ttttctctat cactgatagg gagtggtaaa ctgactttt acttttctct atcactgata 3120
 gggagtggta aactcgactt tcacttttct ctatcactga tagggagtgg taaactcgaa 3180
 atgtcgacta tgcggaccga gcgcggagt ataaatagag gcgcttcgtc tacggagcga 3240
 caattcaatt caaacaagca aagtgaacac gtcgctaagc gaaagctaag caaataaaca 3300
 agcgcagctg aacaagctaa acaatctgag ctagccacca tggttgttat taaacgtaga 3360
 tttggaatt ttaaaagcat attttttct ttgaaattca taagttatca attatcgatg 3420
 gaaatgtatt ctatggagaa cgttttacct gatgaatggg tgcaaaaatt attttacctt 3480
 caaatctaca atcaacacac gctaactttt gtgacttgat caactctcac ctggaaaagc 3540
 -aaccaactac-aatcaacatt.ctatgggata.atcgacaagt gagtaaaatt atagccggac 3600
 ctcttagtac agtgatttta aaaggggaat aatattctat caataggaat aaaaataagg 3660
 tcagcagcca tgacttttcc atcattttga atatacctta tttgtttcgg gattaattgg 3720
 gggtcggaaa tectcttgaa ttcagaaacg ggaaccggag gaagggtgag gtctttcaga 3780
 aagctgtgaa aaataccaac atttctgctg ccaagagctc aataagaagt ttcaaaaatt 3840
 gtcttgatg ttgcagctgt ggctgctaag taataagaca tctattagta tctagatttg 3900
 ttagaccatt taacatagtg ttttaaacga tggggttaat agatgagggt taagaagcta 3960
 gttatattac tgttgctgta acgccttcaa ttgtcgggta cagagcaaac attattgaat 4020
 gttaatgtaa agagtttatt tgttttctag taaacatata gcgattgggt agtaatcact 4080
 aatagaaatt tttcataagt atcaaaaaag taaacctctt tttcagtcta tgtaataagt 4140
 aaaccaagga aagggaat atctacaatc aacaagccat tgttcagca acaaagcaac 4200
 tgaaactaca atcaacattc aataaacttg ggtaatttg aatttaattc tctgggacac 4260
 ctgtggatta caacaatcaa ctcgaaactt attatacaat gtaataaaaa attgatatgc 4320
 atacatgaag atcaagtga attccattta gaatcaattt ttttogaata ttaagtttct 4380

tgctttaatt tatctgaaag taaatagaca ttccaaattc aagttaacaa attaataatg 4440
 aattgactag tgatttttaa gagaaaaaga taagatttaa aaaaggaaag cttttcttga 4500
 taaatttttg aaccacttta tgccgtttca atcataaaaa cttttaagaa cacatgactg 4560
 gtaaaattaa tttaaaacaa atttaaattt tcaacgtaac attcaacaaa aatgggtgaaa 4620
 actatcacgg aaattgttaa tattaatatg tcccaaaaat agcctttgta tgtatatgat 4680
 actaatccat acatctatgg tatctatagg tgaaggctca aagcctctgg gcgctctcct 4740
 gggcctgccc gaaagccaaa cggagcttga taatcttaca gaatacaaca cggcccacaa 4800
 tcggcgcatc tcaatgctgg gcacgatga tgataccaat atgcgaaagc aaaacgcctt 4860
 gaaacaggga cggcgccactc gaaatgtcac atttaacgat gaggagattg tcatcaatcc 4920
 tgaggatgtg gatcctaattg tgggacgctt caggaaactg gtacaaacca ctgtggtgcc 4980
 cgccaagagg gctcgctgcg acgtcaacca ttagtgataa cgctctaga gctgagaact 5040
 tcagggtgag tttggggacc cttgattggt ctttcttttt cgctattgta aaattcatgt 5100
 tatatggagg gggcaaagtt ttcagggtgt tgtttagaat ggggaagatgt cccttgtatc 5160
 accggtgatc ataatacagc ataccacatt ttagagaggt ttacttgctt taaaaacct 5220
 cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attggtgttg ttaacttggt 5280
 tattgcagct tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatcca caataaagc 5340
 atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttaacgcga 5400
 gtttaaacgc gtccgcatac gtccgctcac gttaagttcc gcagagagaa gttgttgaaa 5460
 acataaacag aatcacttgt tgcaactctt gagaaaaactg gggctattgc ggaaaaaacc 5520
 -aactaaaaat-attgcagggtt -aggggtacta -cgctcgattg gcgtacggcc accacttttg 5580
 cgacttcaat gtttaaccgt accttcatag agacttttac ccgataaatg ttatgtagtt 5640
 tgactttctc tgtaatacac aagaaaaaat attgtggaaa ttaaaattat ctcaaactca 5700
 ataaggaaat aataatatat acacctatgt tttatagaag tcaacagtaa ataagttatt 5760
 tggaaaacca ttgtagccgt ttaataaat ctcttgagt gtgttttaaa taacggtcat 5820
 taagtatatt acttggccct ctgaatttct tgaattacac cattttttga aataaatcaa 5880
 tccaaaagac tacttttttg tggcaaatga actgcataaa aagtaacaaa agaaatatgt 5940
 ttttgaaata acagtatagc tgaagtgtat taaaaatac cgcatatga gcgaccgct 6000
 gttaccgctt cgctgcgaat gacaaaacgg gctgagcaag aaaatggcgt agaaggcgac 6060
 gaaaattcgt ttcaactgtg aagaaaacct cgataactga ggaatacagc tgggatttaa 6120
 agagcatatt cgaactacaa gcagagatgt ttcttggtgg aaacggaaac gccgatttgg 6180
 gctacaacaa gcatgccac gtccatggac ttggacaaca tggccatggg cacaaccata 6240
 atcacaatca gttctgcgc agccccacc accccccaca catttttcac tgccctccgg 6300
 gggcggtcag ggcattgtga cgcccatggt agccgcgggc ctgcgctcg ccatgcaggg 6360

tggcggttggc atcgattggc gcagctcgcc cagcaatgga ttaattaact cgcgttaaga 6420
 tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt 6480
 gaaatttgtg atgctattgc tttatttcta accattataa gctgcaataa acaagttaac 6540
 aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga gggtttttta 6600
 agcaagtaaa acctctacaa atgtggtatg gctgattatg atcagttatc tagatccggt 6660
 ggatcttacg ggtcctccac cttccgcttt ttcttgggtc gagatctcag gaacagggtg 6720
 tggcgccctt cgggtgcgtc gtactgctcc acgatgggtg agtcctcggt gtgggagggt 6780
 atgtccagct tggcgccac gtagtagtag ccgggcagct gcacgggctt cttggccatg 6840
 tagatggact tgaactccac caggtagtgg ccgcgctcct tcagcttcag ggccttgtgg 6900
 gtctcgccct tcagcacgcc gtgcggggg tacaggcgct cgggtggaggc ctccagccc 6960
 atggtcttct tctgcatcac ggggccgtcg gaggggaagt tcacgccgat gaacttcacc 7020
 ttgtagatga agcagccgtc ctgcaggag gagtccctggg tcacggctgc cagccgccg 7080
 tctcgaagt tcatcacgcg ctcccacttg aagccctcgg ggaaggacag cttctttag 7140
 tcggggatgt cggcggggtg cttcacgtac acctgggagc cgtactggaa ctggggggac 7200
 aggatgtccc aggcgaaggg cagggggccg ccttgggtca ccttcagctt caggggttg 7260
 tggccctcgt agggggggcc ctgcctcctg ccctcgatct cgaactcgtg gccgttcacg 7320
 gtgccctcca tgcgcacctt gaagcgcagt aactcgggtga tgacgttctc ggaggaggcc 7380
 atggtggcga ccggtttgcg cttcttcttg ggtgggggtg gatccccgat ctgcattttg 7440
 gattattctg cgggtcaaaa tagagatgtg gaaaattagt acgaaatcaa atgagtttcg 7500
 -ttgaaattac.aaaactattg aaactaactt.cctggctggg gaataaaaat gggaaactta 7560
 tttatcgacg ocaactttgt tgagaaacct ctattaacct tctacgaata ttggaacaaa 7620
 ggaaagcgaa gaaacaggaa caaaggtagt tgagaaacct gttccgttgc tcgtcatcgt 7680
 tttcataatg cgagtgtgtg catgtatata tacacagctg aaacgcagtc atacacatta 7740
 ttttgtgtgt atatggtgac gtcacaacta ctaagcaata agaaattttc cagacgtggc 7800
 tttcgtttca agcaacctac tctatttcag ctaaaaataa gtggatttcg ttggtaaaat 7860
 acttcaatta agcaaagaac taactaacta ataacatgca cacaaatgct cgagtgcgtt 7920
 cgtgatttct cgaattttca aatgcgtcac tgcgaatttc acaatttgcc aataaatctt 7980
 ggcgaaaatc aacacgcaag ttttatttat agatttgttt gcgttttgat gccaatlgat 8040
 -tgggaaaaca agatgcgtgg ctgccaatct cttattttgt aattacgtag agcgttgaat 8100
 aaaaaaaaaa tggccgaaca aagacctga aatgcagttt ttcttgaaat tactcaacgt 8160
 cttgttgctc ttattactaa ttggtaacag cgagttaaaa acttacgttt cttgtgactt 8220
 tcgagaatgt tcttttaatt gtactttaat caccaacaat taagtataaa ttttccgtg 8280
 attgcgcttt actttctgct tgtacttgct gctgcaaatg tcaattgggt ttgaaggcga 8340

ccgttcgcga acgctgttta tataccttcg gtgtccgttg aaaatcacta aaaaataccg 8400
 tagtggttcgt aacacttttag tacagagaaa aaaaattgtg ccgaaatggt tttgatacgt 8460
 acgaatacct tgtattaaaa ttttttatga tttctgtgta tcactttttt tttgtgtttt 8520
 tcgttttaaac tcaccacagt acaaaacaat aaaatatttt taagacaatt tcaaattgag 8580
 acctttcttcg tactgacttg accggctgaa tgaggatttc tacctagacg acctacttct 8640
 taccatgaca ttgaatgcaa tgccaccttt gatctaaact taaaaagtc caaggcttgt 8700
 taggattggt gtttatttag tttgcttttg aaatagcaact gtcttctcta ccggctataa 8760
 ttttgaaact cgcagcttga ctggaaattt aaaaagtaat tctgtgtagg taaaggggtg 8820
 tttaaaagtg tgatgtgttg agcgttgagg caacgactgc tatttatgta tatattttca 8880
 aaacttattg tttttgaagt gttttaaatg gagctatctg gcaacgctgc gcataatctt 8940
 acacaagctt ttcttaatcc atttttaagt gaaatttgtt tttactcttt cggcaaataa 9000
 ttgttaaatc gctttaagtg ggcttacatc tggataagta atgaaaacct gcatattata 9060
 atattaaaac atataatcca ctgtgcttcc ccggtgtgtg gccatatacc taaaaaagtt 9120
 tatttttcga gagccccga cggtcacact acggttcggc gattttcgat tttggacagt 9180
 actgattgca agcgcaccga aagcaaaatg gagctggaga ttttgaacgc gaagaacagc 9240
 aagccgtacg gcaagggtgaa ggtgccctcc ggccgcaacg ccatcggcga tctgcgcgcc 9300
 ctaattcaca agaccctgaa gcagacccca cgcgcgaatc gccagtcgct tcgtctggaa 9360
 ctgaagggca aaagcctgaa agatacggac acattggaat ctctgtcgct gcgttcgggc 9420
 gacaagatcg gggtaacctg cggccgctca tttaaatctg gccggcctgg ccgatctgac 9480
 -aatgttcagt -gcagagactc -ggctacgctc -cgtggacttt gaagttgacc aacaatgttt 9540
 attcttacct ctaatagtcc tctgtggcaa ggtcaagatt ctgttagaag ccaatgaaga 9600
 acctggttgt tcaataacat tttgttcgtc taatatttca ctaccgcttg acgttggtgtg 9660
 cacttcatgt acctcatcta taaacgcttc ttctgtatcg ctctggacgt catcttcact 9720
 tacgtgatct gatatttcac tgcagaatc ctcaccaaca agctcgtcat cgctttgcag 9780
 aagagcagag aggatatgct catcgtctaa agaactaccc attttattat atattagtca 9840
 cgatatctat aacaagaaaa tatatatata ataagttatc acgtaagtag aacatgaaat 9900
 aacaatataa ttatcgtatg agttaaatct taaaagtcac gtaaaagata atcatgcgtc 9960
 attttgactc acgcggtcgt tatagttcaa aatcagtgac acttaccgca ttgacaagca 10020
 cgcttcccg gagctccaag cggcgactga gatgtcctaa atgcacagcg acggattcgc 10080
 gctattttaga aagagagagc aatatttcaa gaatgcattg gtcaatttta cgcagactat 10140
 ctttctaggg ttaaaaaaga tttgcgcttt actcgacctc aacttttaaac acgtcataga 10200
 atcttcgctt gacaaaaacc acattgtggc caagctgtgt gacgcgacgc gcgctaaaga 10260
 atggcaaac aagtcgcgcg agcgtcgacc tgcaggcatg caagcttgca tgcttcagc 10320

tcgaaattcg taatcatggt catagctggt tctgtgtga aattgttatt cgctcacaat 10380
 tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaagcc tgggggtgcct aatgagttag 10440
 ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg 10500
 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg gggttgcgta ttgggcgctc 10560
 ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcgggtatc 10620
 agctcaactca aaggcggtaa tacgggttatt cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 10680
 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgcgtggcgtt 10740
 ttcccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg 10800
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 10860
 ctctcctggt cgcacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag 10920
 cgtggcgctt tctcaatgct cagctgttag gtatctcagt tcgggttagg tcgttcgctc 10980
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa 11040
 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 11100
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc 11160
 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatctgct gctctgctga agccagttac 11220
 ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg 11280
 tttttttgtt tgcaagcagc agattacgog cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 11340
 gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaa tcacgttaag ggattttggt 11400
 catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta aattaaaaat gaagttttta 11460
 .atcaatctaa..agtatatatg .agtaaaacttg gtctgacagt .taccaatgct .taatcagtga 11520
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttct ttcacacata gttgcctgac tccccgtcgt 11580
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgcctgca tgataccgcg 11640
 agaccacgc tcaccggctc cagatttatt agcaataaac cagccagccg gaagggccga 11700
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 11760
 agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 11820
 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgac 11880
 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 11940
 gatcgttgct agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg cagcactgca 12000
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt agtactcaac 12060
 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccgg cgtaataacg 12120
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 12180
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg 12240
 tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gttctcgggt gagcaaaaac 12300

aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 12360
 actottcett ttccaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 12420
 catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa 12480
 agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg 12540
 tatcacgagg ccccttcgtc tcgcgcggtt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat 12600
 gcagctcccg gagacgggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg 12660
 tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga 12720
 gcagattgta ctgagagtgc accatatatg cggatgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 12780
 agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttccggctgc gcaactgttg ggaagggcga 12840
 tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 12900
 ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgc 12960
 aagctttgtt taaaatataa caaaattgtg atcccacaaa atgaagtggg gcaaaatcaa 13020
 ataattaata gtgtccgtaa acttgttggg ctccaacttt ttgaggaaca cgttgacgg 13080
 caaatccgtg actataacac aagttgattt aataatttta gccaacacgt cgggctgcgt 13140
 gttttttgcc gacgcgtctg tgtacacgtt gattaactgg tcgattaaac tgttgaaata 13200
 atttaatttt tggttcttct ttaaattctg gatgaaattt tttaaaataa ctttaaattc 13260
 ttcattggtg aaaaatgccg cgttttgcaa cttgtgaggg tctaataatga ggtcaaactc 13320
 agtaggagtt ttatccaaaa aagaaaacat gattacgtct gtacacgaac gcgtattaac 13380
 gcagagtgcg aagtataaga ggggttaaaaa atatatttta cgcaccatat acgcatcggg 13440
 ttgatatcgt taatatggat caatttgaac agttgattaa cgtgtctctg ctgaagtctt 13500
 tgatcaaaac gcaaactgac gaaaatgtgt cggacaatat caagtogatg agcgaaaaac 13560
 taaaaagggt agaatacgac aatctcacag acagcgttga gatatacggg attcacgaca 13620
 gcaggctgaa taataaaaaa attagaaact attatttaac cctagaaaga taatcatatt 13680
 gtgacgtacg ttaaagataa tcatgcgtaa aattgacgca tgtgttttat cggctctgtat 13740
 atcgaggttt atttattaat ttgaatagat attaagtttt attatattta cacttacata 13800
 ctaataataa attcaacaaa caatttattt atgtttattt atttattaaa aaaaaacaaa 13860
 aactcaaaat ttcttctata aagtaacaaa acttttaaac attctctctt ttacaaaaat 13920
 aaacttattt tgtactttaa aaacagtcac gttgtattat aaaataagta attagcttaa 13980
 cttatacata atagaaacaa attataacta ttagtcagtc agaaacaact ttggcacata 14040
 tcaatattat gctctcgaca aataactttt ttgcattttt tgcacgatgc atttgccttt 14100
 cgccttattt tagaggggca gtaagtacag taagtacgtt ttttcattac tggctcttca 14160
 gtactgtcat ctgatgtacc aggcacttca tttggcaaaa tattagagat attatcgcgc 14220
 aaatatctct tcaaagtagg agcttctaaa cgcttacgca taaacgatga cgtcaggctc 14280

atgtaaagggt ttctcataaa ttttttgoga ctttggacct tttctccctt gctactgaca 14340
 ttatggctgt atataataaa agaatttatg caggcaatgt ttatcattcc gtacaataat 14400
 gccataggcc acctattcgt ctctctactg caggtcacat cagaacacat ttggtctagc 14460
 gtgtccactc cgccttttagt ttgattataa tacataacca tttgcgggtt accggtactt 14520
 tcgttgatag aagcatcctc atcacaagat gataataagt ataccatctt agctggcttc 14580
 ggttttatatg agacgagagt aaggggtccg tcaaaacaaa acatcgatgt tcccactggc 14640
 ctggagcgac tgtttttcag taactccggg atctcgcgtt tgtttgatcg cacgggtccc 14700
 acaatgggtg cggccagccc 14720

5 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de PCR

15 <400> 25
 catcgatgcc cagcattgag atg 23

20 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador de PCR

30 <400> 26
 caagcaaatg gaacacgtcg ctaagcgaaa gcta 34

35 <210> 27
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador de PCR

45 <400> 27
 gccatccacg ctgttttgac ctccatag 28

50 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador de PCR

50 <400> 28
 gccatacaa tgtaggctgc tctacac 27

50 <210> 29
 <211> 1005
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 447 422 T3

<220>

<223> Región codificante de tTA de pUHD15-1

<400> 29

5

```

atgtctagat tagataaaag taaagtgatt aacagcgcat tagagctgct taatgaggtc      60
ggaatcgaag gtttaacaac cogtaaaactc gcccagaagc taggtgtaga gcagcctaca      120
ttgtattggc atgtaaaaaa taagcgggct ttgctcgacg ccttagccat tgagatgtta      180
gataggcacc atactcactt ttgcccttta gaaggggaaa gctggcaaga ttttttacgt      240
aataacgcta aaagtttttag atgtgcttta ctaagtcacg gcgatggagc aaaagtacat      300
ttaggtacac ggccacaga aaaacagtat gaaactctcg aaaatcaatt agccttttta      360
tgccaacaag gtttttact agagaatgca ttatatgcac tcagcgtgtt ggggcatttt      420
actttagggtt gcgtattgga agatcaagag catcaagtcg ctaaagaaga aagggaaca      480
cctactactg atagtatgcc gccattatta cgacaagcta tcgaattatt tgatcaccaa      540
ggtgcagagc cagccttctt attcggcctt gaattgatca tatgcggatt agaaaaacaa      600
cttaaatgtg aaagtgggtc cgcgtacagc cgcgcgcgta cgaaaaacaa ttacgggtct      660
accatcgagg gcctgctcga tctcccgac gacgacgcc ccgaagaggc ggggctggcg      720
gctccgcgcc tgtcctttct ccccgcgga cacacgcgca gactgtcgac ggcccccccg      780
accgatgtca gcctggggga cgagctccac ttagacggcg aggacgtggc gatggcgcac      840
gccgacgcgc tagacgattt cgatctggac atgttggggg acggggattc cccgggtccg      900
ggatttacctt ccacagactc cgcacctac ggcgctctgg atatggcoga cttcgagttt      960
gagcagatgt ttaccgatgc ccttggaatt gacgagtacg gtggg                      1005

```

<210> 30

<211> 336

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> tTA

15

<400> 30

```

Met Gly Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
1           5           10           15

```

```

Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
          20           25           30

```

```

Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
          35           40           45

```

Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 50 55 60

His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 65 70 75 80

Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp
 85 90 95

Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 100 105 110

Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
 115 120 125

Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
 145 150 155 160

Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
 165 170 175

Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
 180 185 190

Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
 195 200 205

Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile Glu
 210 215 220

Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg Leu
 245 250 255

Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu
 260 265 270

Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 275 280 285

Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr
 290 295 300

Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu
 305 310 315 320

ES 2 447 422 T3

Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
325 330 335

<210> 31
<211> 1017
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> tTAV

<400> 31

```

atgggcagcc gcctggataa gtccaaagtc atcaactccg cgttggagct gttgaacgaa      60
gttggcattg agggactgac gacccgcaag ttggcgcgaga agctgggctg ggagcagccc      120
accctctact ggcacgtgaa gaataagcgg gcgctgctgg atgccctggc catcgagatg      180
ctcgaccgcc accacacgca tttttgcccg ttggaaggcg agtcctggca ggacttcctc      240
cgcaataacg ccaagtcgtt cgcctgcgct ctgctgtccc accgagacgg tgccaaagtc      300
catctcggca cgcgcccgcg cgaaaagcaa tacgagacac tggagaacca gctcgcgttc      360
ctgtgccagc aaggcttcag cctggaaaat gctctctacg ctctgagcgc cgtcgggtcac      420
tttaccctgg gctgcgtgct ggaggaccaa gagcatcaag tcgcaaaaga ggagcgcgag      480
accccaacaa ccgattcgat gcccactg ctgcgtcagg caatcgagct gttcgatcat      540
caaggagccg agccggcatt cctgttcggc ttggagctga ttatctgcgg attggaaaag      600
caactgaaat gcgagtcggg ctcggggccc gcgtacagcc gcgcgcgtac gaaaaacaat      660
tacgggtcta ccatcgaggg cctgctcgat ctcccggacg acgacgcccc cgaagaggcg      720
gggctggcgg-ctccgcgect-gtcctttctc-cccgcgggac acacgcgcag actgtcgacg      780
gcccccccga ccgatgtcag cctggggggac gagctccact tagacggcga ggacgtggcg      840
atggcgcatg ccgacgcgct agacgatttc gatctggaca tggtggggga cggggattcc      900
cggggtccgg gatttaccac ccacgactcc gcccctacg gcgctctgga tatggccgac      960
ttcgagtttg agcagatggt taccgatgcc cttggaattg acgagtacgg tgggtag      1017

```

<210> 32
<211> 338
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> tTAV

<400> 32

Met Gly Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
20 25 30

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

ES 2 447 422 T3

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly
290 295 300

Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp
305 310 315 320

Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr
325 330 335

Gly Gly

<210> 33
<211> 4455
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> pUHD15-1

<400> 33

```
ctcgaggagc ttggcccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt 60
ggctcatgtc caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 180
gtaaatggcc cgcttggtg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 300
cgctaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt 360
gacgtcaatg acggtaaatg gccgcctgg cattatgcc agtacatgac cttatgggac 420
tttctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcactcgcta ttaccatggg gatgcgggtt 480
tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac 540
ccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 600
cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtotat 660
ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atgcctgga gacgccatcc acgctgtttt 720
gacctcata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gcccgaatt catatgtcta 780
gattagataa aagtaaagtg attaacagcg cattagagct gcttaatgag gtcggaatcg 840
aaggtttaac aaccgtaaa ctgcccaga agctaggtgt agagcagcct acattgtatt 900
ggcatgtaaa aaataagcgg gctttgctcg acgccttagc cattgagatg ttagataggc 960
accatactca cttttgccct ttagaagggg aaagctggca agatttttta cgtaataacg 1020
ctaaaagttt tagatgtgct ttactaagtc atcgcgatgg agcaaaagta catttaggta 1080
cacggcctac agaaaaacag tatgaaactc tcgaaaatca attagccttt ttatgccaac 1140
aaggtttttc actagagaat gcattatatg cactcagcgc tgtggggcat ttacttttag 1200
gttgcgtatt ggaagatcaa gagcatcaag tcgctaaga agaaagggaa acacctacta 1260
```

ctgatagtat gccgccatta ttacgacaag ctatcgaatt atttgatcac caaggtgcag 1320
 agccagcctt cttattcggc cttgaattga tcatatgcgg attagaaaaa caacttaaat 1380
 gtgaaagtgg gtccgcgtac agccgcgcgc gtacgaaaaa caattacggg tctaccatcg 1440
 agggcctgct cgatctcccg gacgacgacg cccccaaga ggcggggctg gcggctccgc 1500
 gcctgtcctt tctccccgcg ggacacacgc gcagactgtc gacggcccc cgcaccgatg 1560
 tcagcctggg ggacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg catgccgacg 1620
 cgctagacga tttcgatctg gacatgttgg gggacgggga ttccccgggt ccgggattta 1680
 cccccacga ctcggcccc tacggcgctc tggatatggc cgacttcgag tttgagcaga 1740
 tgtttaccga tgcccttggg attgacgagt acggtgggta gggggcgcg ggatccagac 1800
 atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc 1860
 tttatttctg aaatttctga tgctattgct ttatttctaa ccattataag ctgcaataaa 1920
 caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag 1980
 gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtgggtatg ctgattatga tcttgcagc 2040
 ctctctctct ggccggacca cgctatctgt gcaaggctcc cggacgcgcg ctccatgagc 2100
 agagcgcccg ccgcgagggc aagactcggg cggcgccctg cccgtccac caggtcaaca 2160
 ggcggttaacc ggctcttca tcgggaatgc gcgcgacctt cagcatcgcc ggcatgtccc 2220
 ctggcgagcg ggaagtatca gctcgaccaa gcttggcgag attttcagga gctaagggaag 2280
 ctaaaatgga gaaaaaatc actggatata ccaccgttga tatatccaa tggcatcgta 2340
 aagaacattt tgaggcattt cagtcagttg ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc 2400
 tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttcg 2460
 cttctctgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 2520
 actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 2580
 gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 2640
 ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 2700
 acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctggg aagctccctc gtgcgctctc 2760
 ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 2820
 cgctttctca atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc 2880
 tgggctgtgt gcacgaacct ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 2940
 gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca - 3000
 ggattagcag agcgaggat gtaggggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 3060
 acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttacottcg 3120
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt 3180
 ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 3240

tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttgggtcatga	3300
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatacaa	3360
tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac	3420
ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga	3480
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc	3540
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca	3600
gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta	3660
gagtaagtag ttccgagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg	3720
tggtgtcacg ctctgctgtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc	3780
gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttcgggt cctccgatcg	3840
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt	3900
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt	3960
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata	4020
ataccgccc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc	4080
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac	4140
ccaactgac ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa	4200
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatactct	4260
tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat	4320
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc	4380
cacctgacgt- ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca	4440
cgaggccctt tcgtc	4455

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de expresión génica que se puede reprimir, operativo en un insecto, que comprende dos elementos en la misma construcción, en la que:
 - 5 el primer elemento comprende al menos un gen de factor de control que hay que expresar y al menos un primer promotor del mismo; y el segundo elemento comprende al menos un segundo promotor y un gen de interés bajo el control de dicho al menos un segundo promotor; en el que un producto del gen de factor de control que hay que expresar sirve como factor de control de la transcripción positivo para ambos, el al menos un primer promotor en dicho primer elemento y el al menos un
 - 10 segundo promotor en dicho segundo elemento, con lo que dicho producto del gen de factor de control, o la expresión de dicho producto del gen factor de control, se puede reprimir, siendo el primer y el segundo promotores, promotores mínimos de insecto, que pueden ser el mismo o diferentes.
2. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se asocia un potenciador con el, o cada, promotor
 - 15 mínimo de insecto, sirviendo el producto génico para potenciar la actividad del, o cada, promotor mínimo de insecto por medio del potenciador.
3. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el factor del control es el producto génico tTA o un análogo que se puede reprimir del mismo, y en el que una o más unidades operadoras tetO están unidas operativamente al promotor y es el potenciador, sirviendo tTA o sus análogos para potenciar la actividad del
 - 20 promotor por medio del tetO.
4. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el gen de factor de control codifica el producto tTAV (SEC ID N° 32).
 - 25
5. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el gen se modifica para casi seguir parcialmente el uso de un codón en una especie en la que el sistema es para su uso.
6. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el primer y/o el segundo promotores están
 - 30 sustancialmente inactivos en ausencia del factor de control de transcripción positivo.
7. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el primer y/o el segundo promotores mínimos de insecto se seleccionan de entre: hsp70, un promotor mínimo P, un promotor mínimo basado en Act5C, un fragmento del promotor BmA3, un promotor core Adh y un promotor Act5C, o combinaciones de los mismos.
 - 35
8. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer y/o el segundo promotores mínimos se derivan de, o son un fragmento de, Hsp70.
9. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que reduce la aptitud biológica cuando se deja de
 - 40 reprimir.
10. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende un gen letal bajo el control de un promotor del sistema.
11. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el gen letal es un gen letal dominante.
 - 45
12. Un sistema de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en el que el gen letal y el gen de factor de control son el mismo.
13. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el gen es tTA o un análogo del mismo.
 - 50
14. Un sistema de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en el que el gen letal y el gen factor de control son diferentes.
15. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la reducción de la aptitud biológica es una alta tasa de mortalidad.
 - 55
16. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la expresión del gen de factor de control es selectiva.
 - 60
17. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la expresión del gen de factor de control está determinado por el sexo.
18. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende una secuencia letal de *sexo doble*,
 - 65 *transformación* o específica del sexo.

19. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el gen de interés está unido operativamente a al menos un promotor mínimo de insecto.
20. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el gen de interés es un gen letal dominante.
21. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el gen de interés codifica ARNi.
22. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que la activación del promotor mínimo de insecto al que está unido operativamente el gen de interés da lugar a un efecto selectivo por medio de un producto de transcripción o de traducción de ADN bajo el control del promotor mínimo de insecto.
23. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que la selección es específica de la especie.
24. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que la selección es específica del estadio de desarrollo.
25. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que es al menos dos cistrones, estando dichos cistrones unidos a un potenciador bajo el control del gen de factor de control.
26. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que al eliminarse un supresor del gen la expresión del gen de factor de control no tiene sustancialmente ningún efecto sobre la aptitud biológica del adulto en el que se ha eliminado el supresor.
27. Un sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, limitado por elementos aisladores.
28. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 27, en el que los aisladores son aisladores no idénticos.
29. pLA513 tal como se identifica por la SEC ID N° 16.
30. JY2004-tTA tal como se identifica por la SEC ID N° 14.
31. Un vector que comprende el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28.
32. Un vector de acuerdo con la reivindicación 31, que comprende además un marcador de expresión.
33. Un vector de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el marcador de expresión es una proteína fluorescente o un marcador de resistencia.
34. Un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, que comprende además un gen de transposasa que se puede expresar.
35. Un insecto que comprende, en su genoma, un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28.
36. Un insecto de acuerdo con la reivindicación 35, que sustancialmente no está amenazado por el sistema bajo condiciones tolerantes cuando el gen factor de control no se expresa.
37. Un insecto de acuerdo con las reivindicaciones 35 o 36 que forma parte de una especie dañina.
38. Un insecto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, que se selecciona de entre: mosquito, gusano rosado, mosca mediterránea de la fruta y *Drosophila*.
39. Un insecto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, en el que la expresión del gen de factor de control es bloqueable o controlable por medio de suplementos de la dieta.
40. Un procedimiento para establecer la compatibilidad de un promotor mínimo de insecto con una especie de insecto, que comprende:
 - 1) Transformar dicha especie con un plásmido, u otro vector, comprendiendo el plásmido o el otro vector:
 - un sistema, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que incluye el promotor mínimo de insecto que hay que ensayar unido operativamente al gen de interés de dicho sistema; y
 - un marcador de transformación, bajo el control de un promotor de marcador de insecto apropiado a dicha especie:
 - 2) Ensayar la expresión del marcador de los individuos transgénicos putativos; y

3) Ensayar la expresión del gen de interés en los individuos que expresan el marcador.

41. El uso del sistema de expresión génica de insectos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14 en el control de una población de insectos dañinos.

5

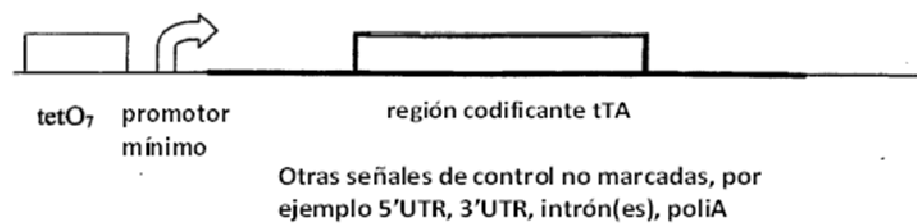


Fig.1

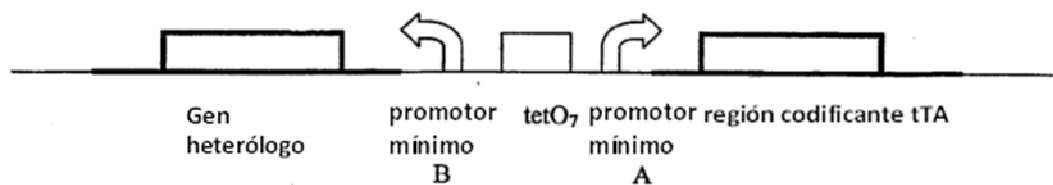


Fig.2

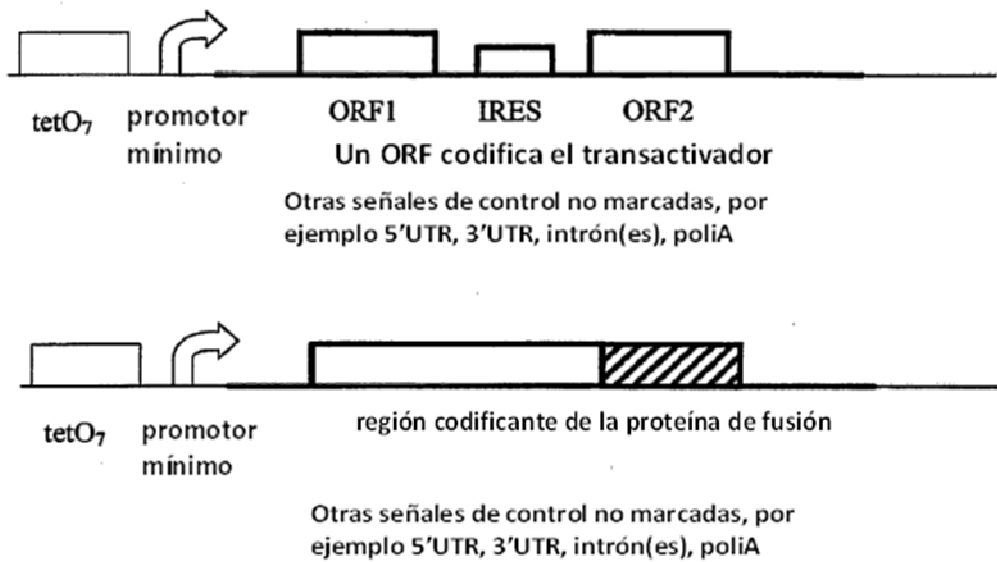
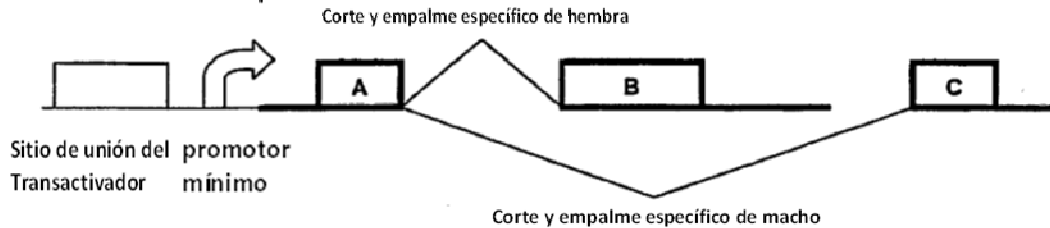


Fig.3

Corte y empalme específico del sexo como
por ejemplo, doble sexo de mosca
mediterránea de la fruta o *Drosophila*



Región codificadora del Transactivador:

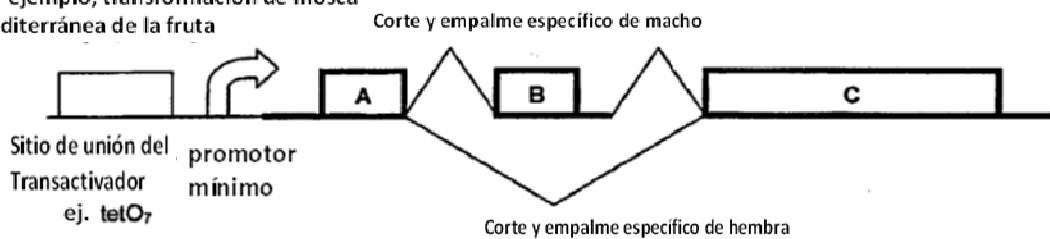
A = dominio de unión de ADN

B = dominio de activación

C = dominio de represión o neutro

Otras señales de control no marcadas, por
ejemplo 5'UTR, 3'UTR, intrón(es), poliA

Corte y empalme específico del sexo como
por ejemplo, transformación de mosca
mediterránea de la fruta



Región codificadora del Transactivador:

A+C=Transactivador

B = contiene el codón de parada o el

desplazamiento de marco de lectura

o

A = dominio de unión de ADN

B = dominio de represión

C = dominio de activación

Otras señales de control no marcadas, por
ejemplo 5'UTR, 3'UTR, intrón(es), poliA

Fig.4

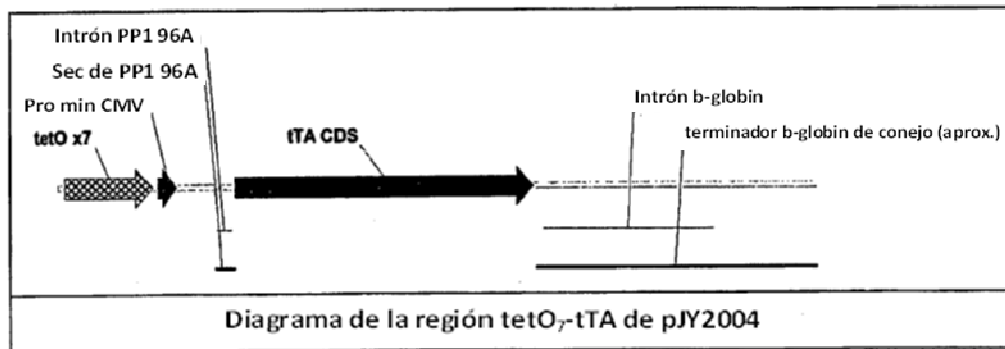


Fig.5

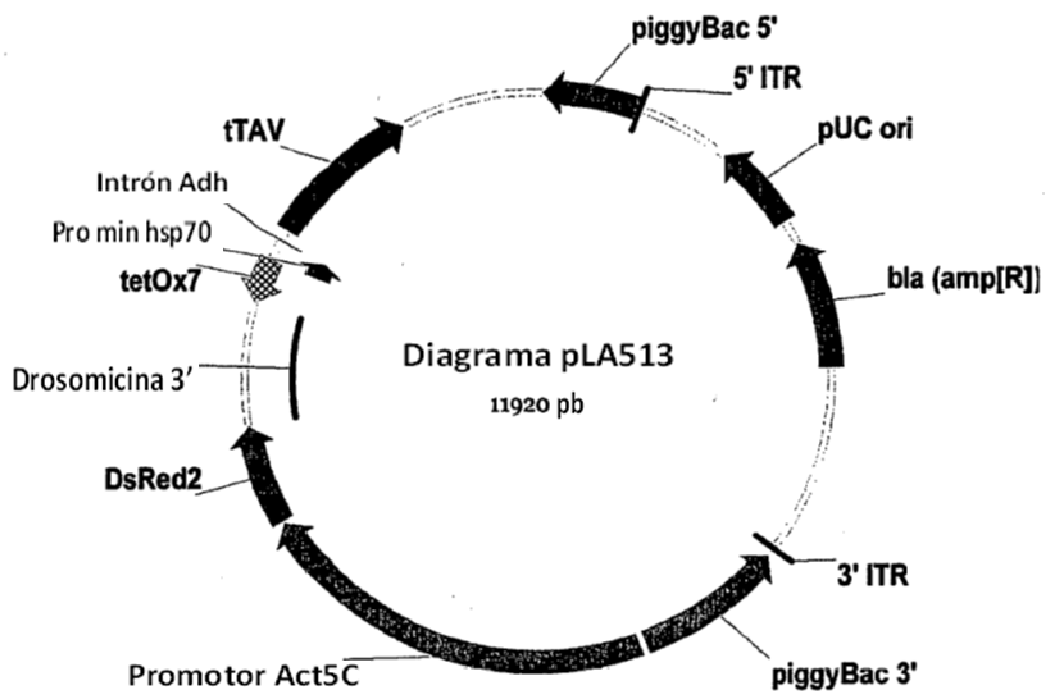


Fig.6

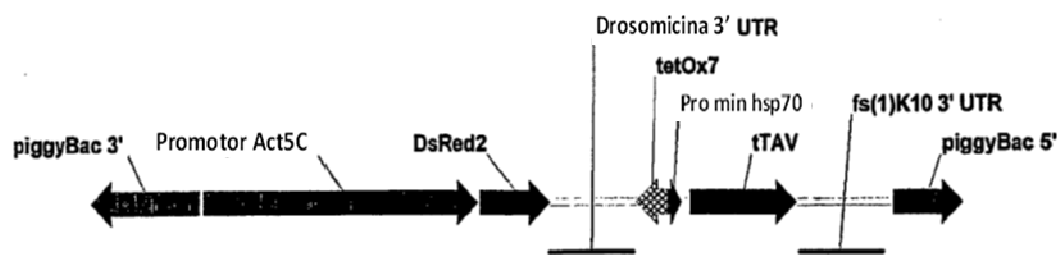


Diagrama esquemático del transposón LA513

Fig.7

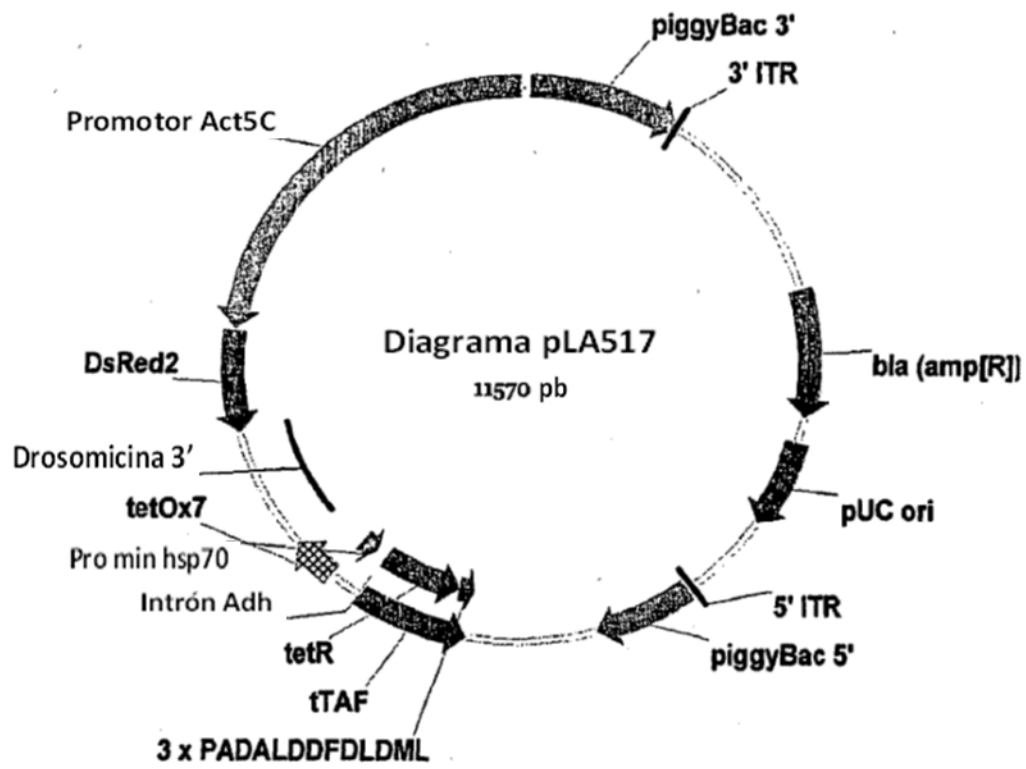


Fig.8

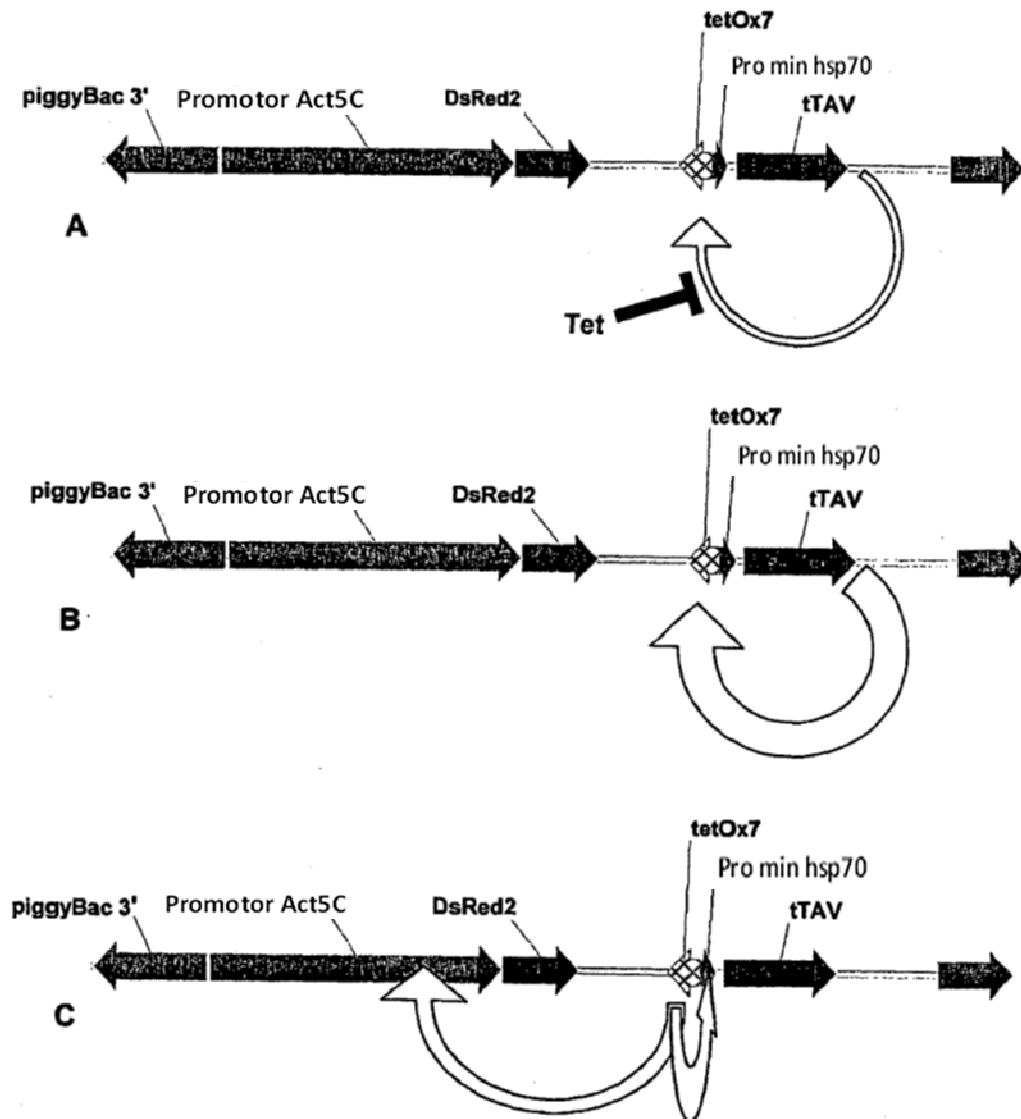


Fig.9

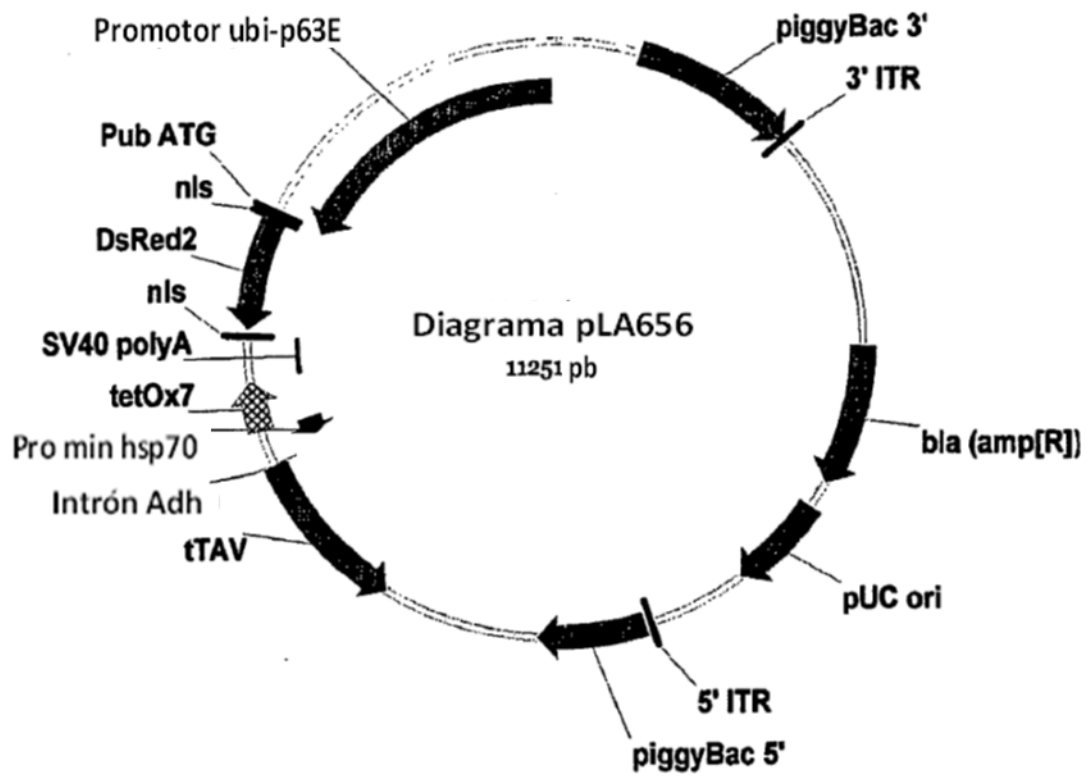


Fig.10

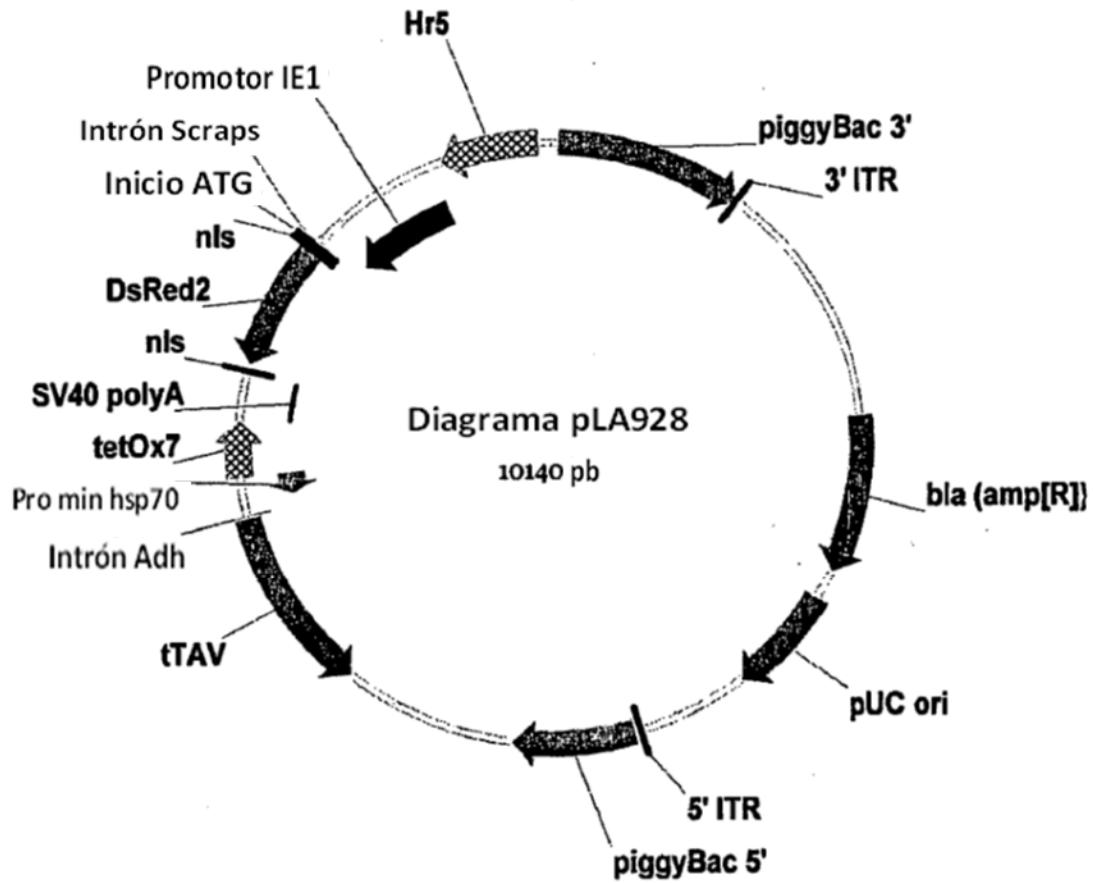


Fig.11

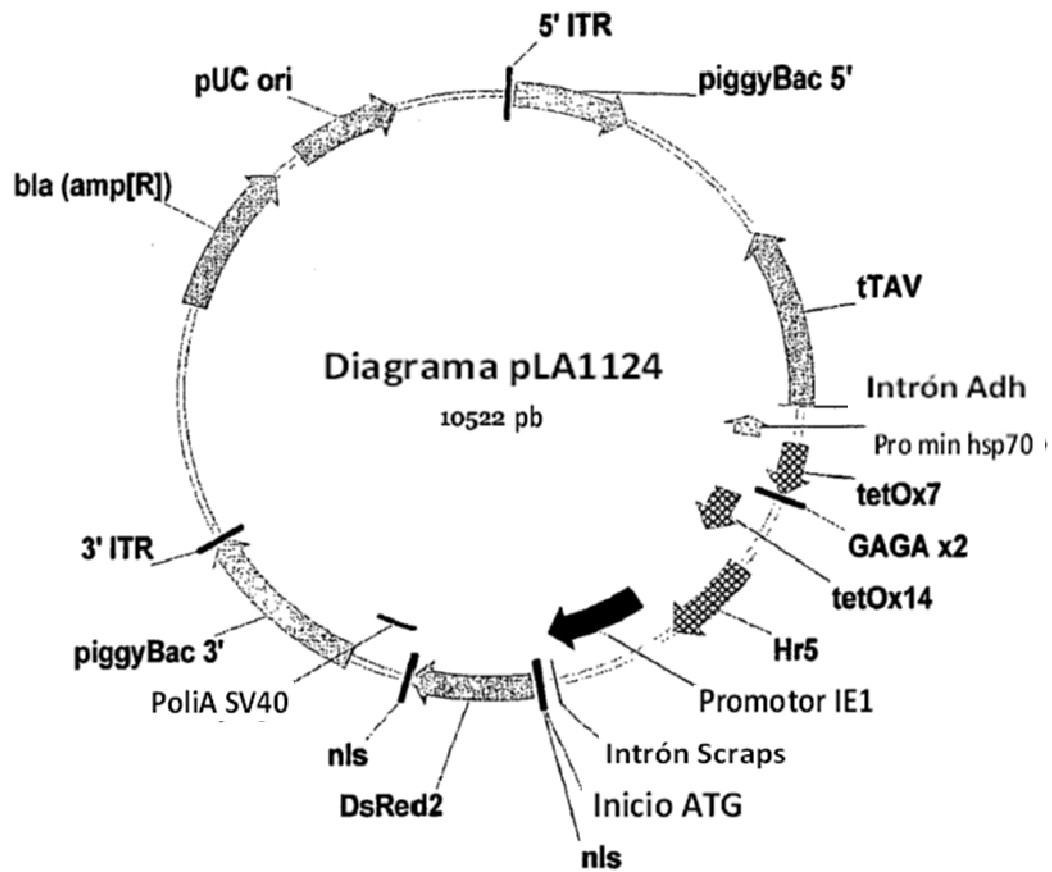


Fig.12

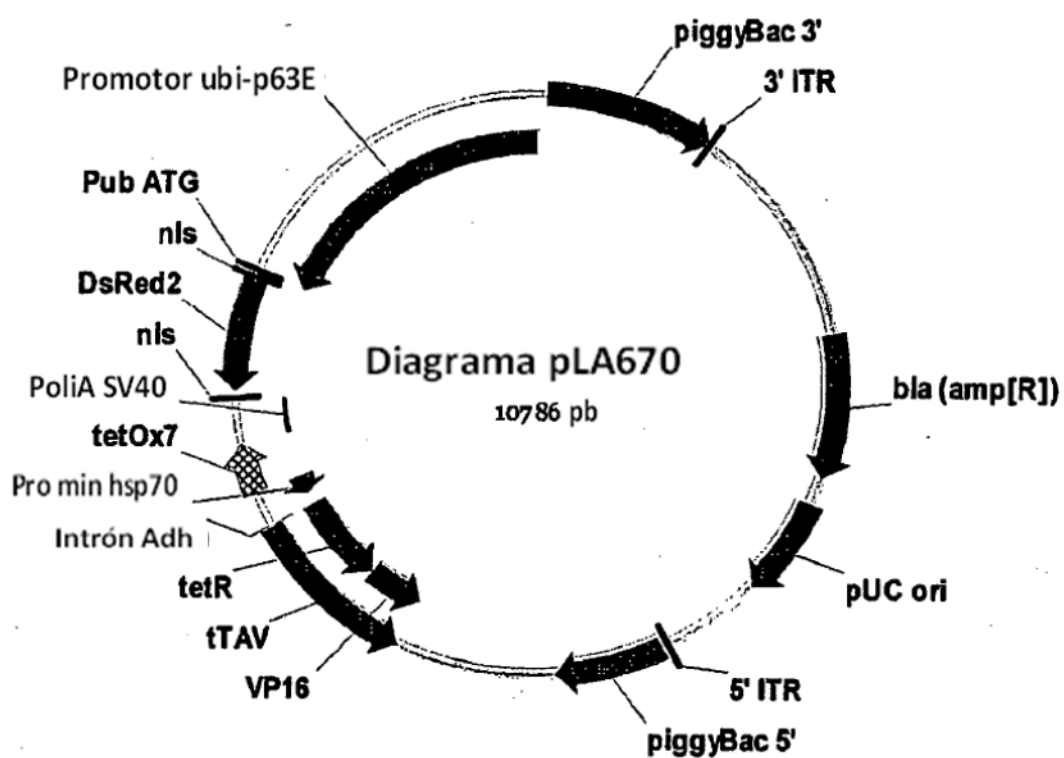


Fig.13

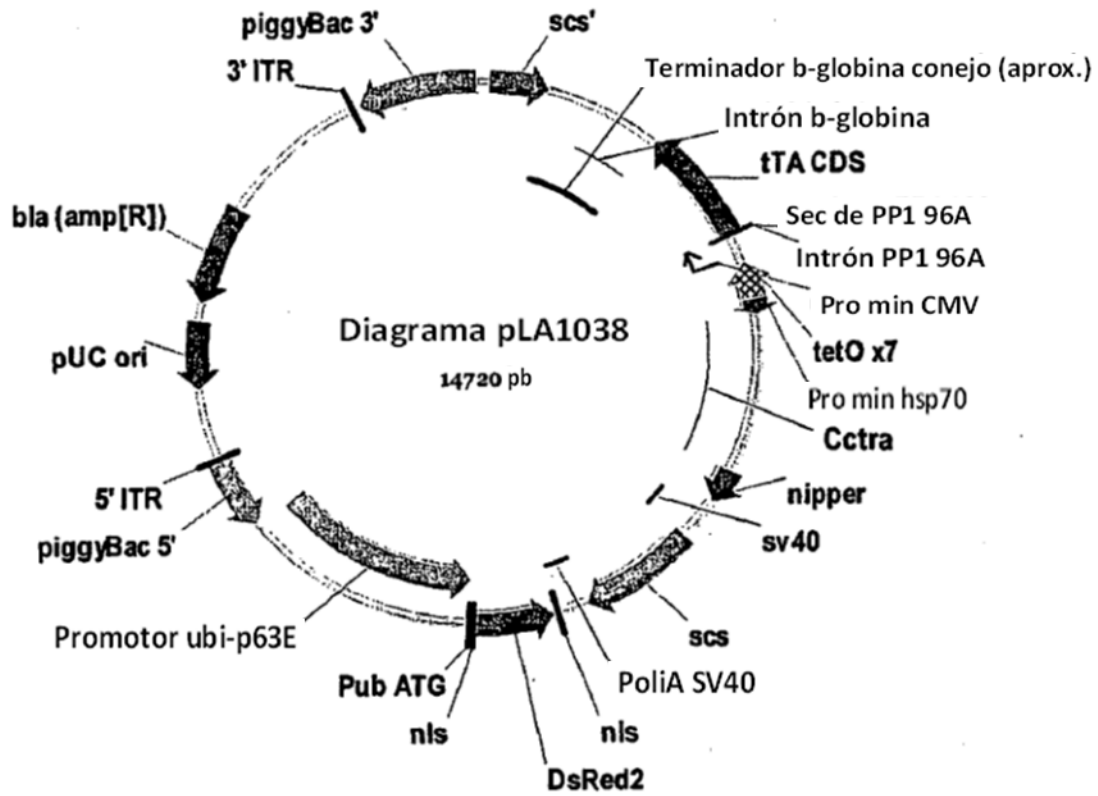


Fig.14

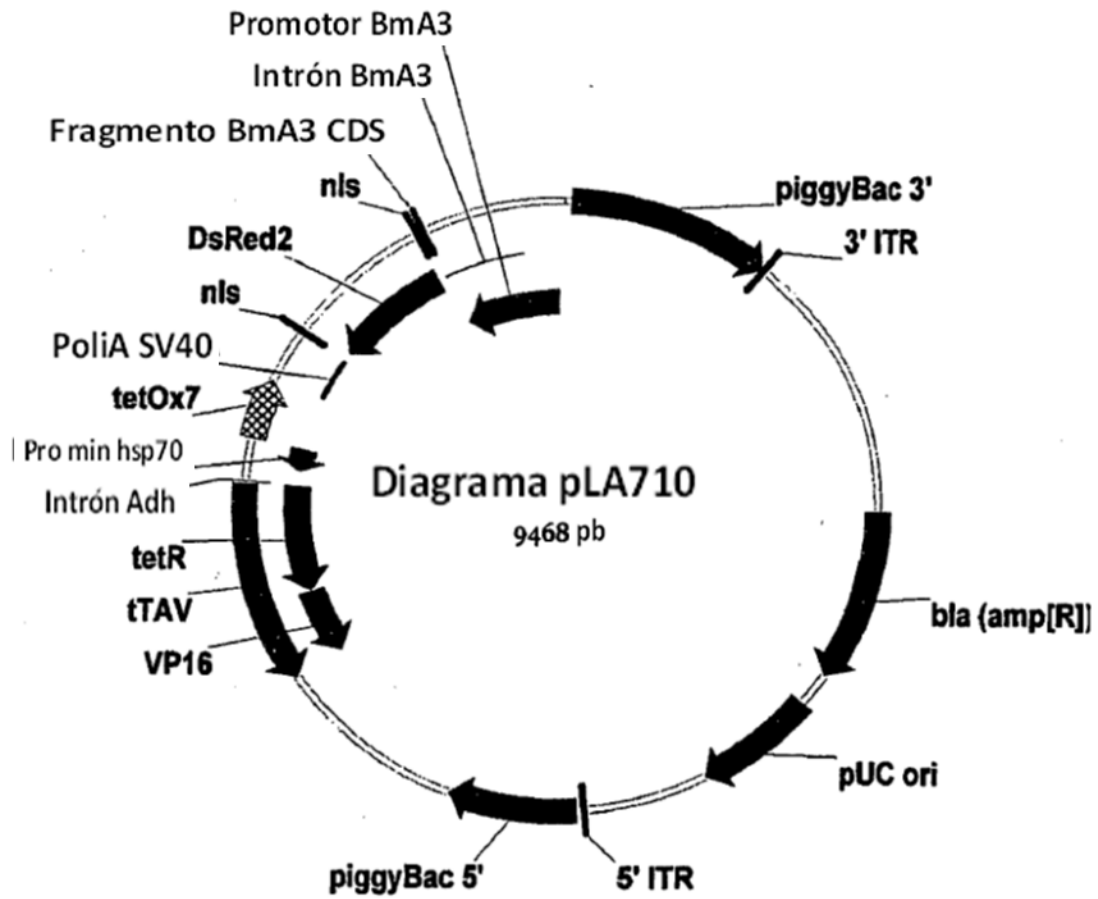


Fig.15

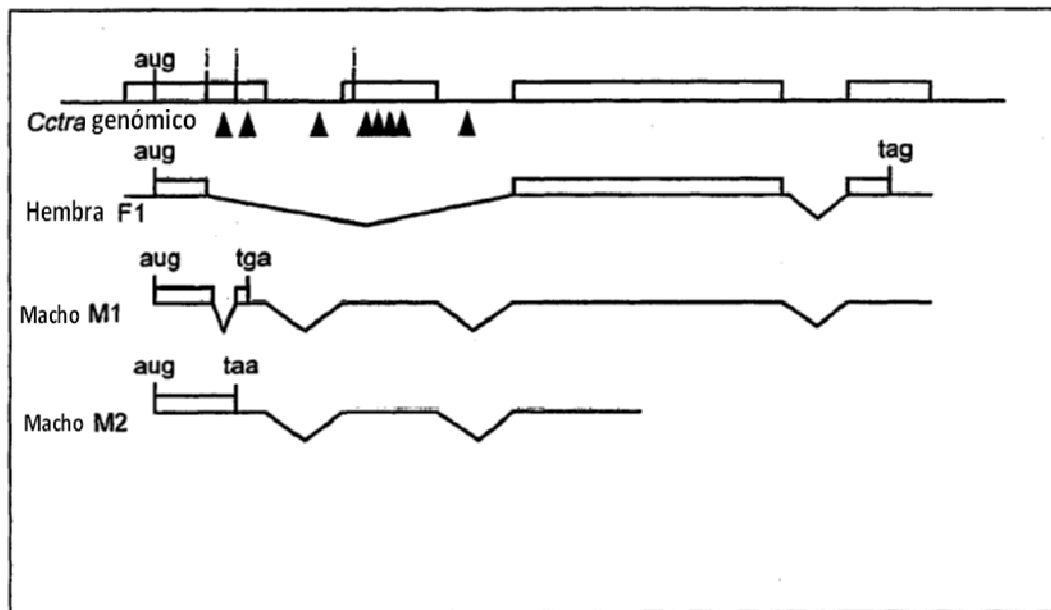


Fig.16

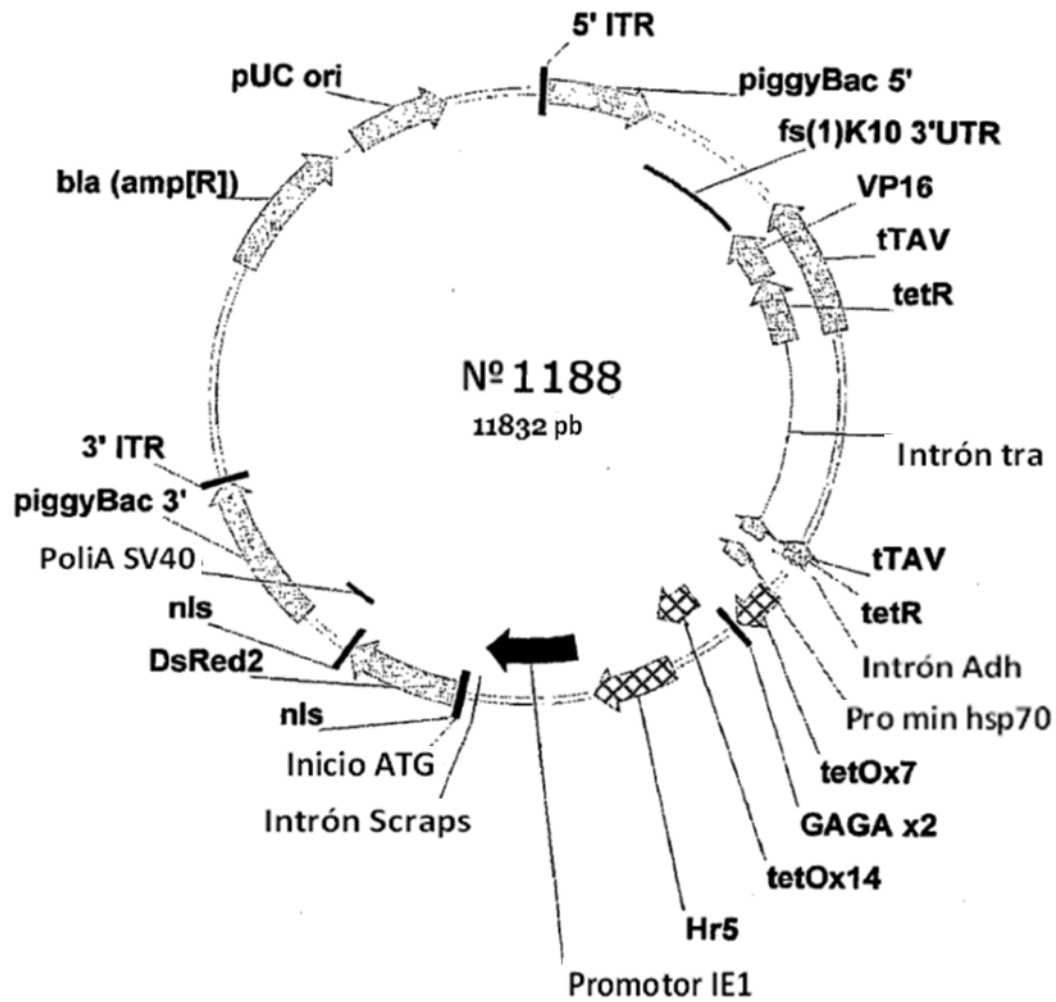
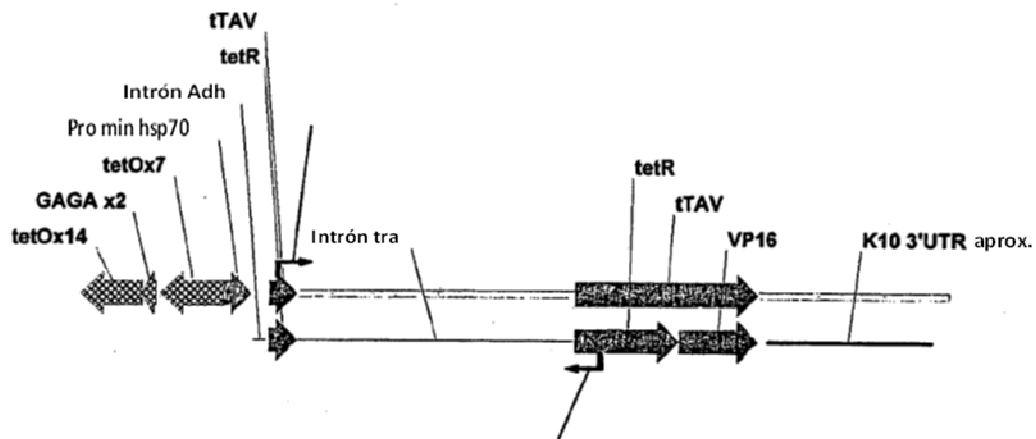


Fig.17



Productos potenciales generados por PCR:

1. Si el intrón no se escinde → ~1550 pb
2. Si el intrón se corta y empalma en forma masculina (M1 o M2) → ~600 pb
3. Si el intrón se corta y empalma en forma femenina → ~200 pb

Fig.18