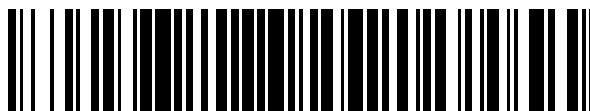


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 132**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06787308 .3**
- 96 Fecha de presentación: **14.07.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1907553**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Sitios de recombinación FRT modificados y métodos de uso**

30 Prioridad:  
**18.07.2005 US 700225 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.11.2012**

73 Titular/es:  
**PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC.**  
**(100.0%)**  
**7100 N.W. 62ND AVENUE**  
**JOHNSTON, IA 50131-1014, US**

72 Inventor/es:  
**TAO, YUMIN;**  
**BIDNEY, DENNIS;**  
**GORDON-KAMM, WILLIAM, J. y**  
**LYZNIK, LESZEK, A.**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 390 132 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

Sitios de recombinación FRT modificados y métodos de uso.

### 5 Campo de la invención

La invención se refiere a sistemas de recombinación específica de sitio y métodos de uso.

### 10 Antecedentes

10 La inserción aleatoria de ADN introducido en el genoma de una célula hospedadora puede ser letal si el ADN foráneo resulta que se inserta en, y por tanto muta, un gen nativo críticamente importante. Además, incluso si un acontecimiento de inserción aleatoria no altera el funcionamiento de un gen de una célula hospedadora, la expresión de una secuencia de nucleótidos foránea insertada puede verse influenciada por efectos de posición causados por el ADN genómico adyacente. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos se inserta en un sitio en el que el efecto de posición es suficientemente fuerte para suprimir la función o regulación de la secuencia de nucleótidos introducida. En otros casos, la sobreproducción del producto génico tiene efectos negativos en una célula.

20 Por ejemplo, en plantas, los efectos de posición pueden provocar una agronomía reducida, costes adicionales para investigación adicional, creación de eventos transgénicos adicionales, y un tiempo más lento de producción. Por estas razones, se necesitan métodos eficaces para dirigir la inserción de secuencias de nucleótidos en el genoma de diversos organismos, tales como plantas, en posiciones cromosómicas que permitan la función deseada de la secuencia de interés.

25 Schlake, T. y Bode, J. (Biochem. (1994) 33:12746-51) describe el uso de sitios de reconocimiento de FLP (FRT) mutados para el intercambio de casetes de expresión en loci cromosómicos definidos.

### Sumario

30 Se proporcionan métodos y composiciones que usan poblaciones de sitios de recombinación FRT modificados aleatorizados para identificar, aislar y/o caracterizar sitios de recombinación FRT modificados. También se proporcionan sitios de recombinación FRT modificados recombinogénicos que pueden emplearse en una diversidad de métodos para recombinación dirigida de polinucleótidos de interés, incluyendo métodos para recombinar polinucleótidos, evaluar la actividad promotora, seleccionar directamente organismos transformados, minimizar o eliminar la expresión resultante de la integración aleatoria en el genoma de un organismo, tal como una planta, eliminar polinucleótidos de interés, combinar múltiples casetes de transferencia, invertir o escindir un polinucleótido, e identificar y/o caracterizar regiones reguladoras de la transcripción.

40 La invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un primer sitio de recombinación FRT que comprende la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de recombinación FRT que comprende la SEC ID N° 39.

La invención proporciona adicionalmente una célula que comprende el polinucleótido de la invención.

45 La invención proporciona adicionalmente una planta que comprende una célula de la invención.

La invención proporciona adicionalmente un método para dirigir la inserción de un polinucleótido de interés a un sitio diana, comprendiendo dicho método:

- 50 (a) proporcionar una célula que tiene integrado establemente en su genoma el sitio diana que comprende una primer sitio de recombinación que comprende la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de recombinación que comprende la SEC ID N° 39;
- (b) proporcionar un casete de transferencia que comprende el polinucleótido de interés, donde dicho polinucleótido de interés está flanqueado por dicho primer y dicho segundo sitios de recombinación; y
- 55 (c) proporcionar una recombinasa FLP, donde dicha recombinasa reconoce y lleva a cabo la recombinación en el primer y el segundo sitios de recombinación, y el polinucleótido de interés se inserta en el sitio diana.

### Descripción detallada

60 La invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un primer sitio de recombinación FRT modificado funcional que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de combinación FRT que comprende la SEC ID N° 39.

65 También se proporcionan organismos, incluyendo, por ejemplo, procariotas, tales como bacterias, y eucariotas, tales como levaduras, plantas, células vegetales, y semillas que comprenden los polinucleótidos mencionados que comprende los sitios de recombinación FRT modificados. En ejemplos específicos, los polinucleótidos se integran de

forma estable en el genoma del organismo.

Se proporciona un método para dirigir la inserción de un polinucleótido de interés. El método comprende proporcionar un sitio diana que tiene un primer y segundo sitios de recombinación funcionales de la invención. Se proporciona un casete de transferencia que comprende un polinucleótido de interés y los dos sitios de recombinación funcionales, donde el segundo sitio de recombinación funcional es recombinogénico con el primer sitio de recombinación funcional, y el primer y/o el segundo sitio de recombinación comprenden un sitio FRT modificado descrito en este documento. Se proporciona al menos una recombinasa. La recombinasa reconoce y lleva a cabo la recombinación en el primer y segundo sitios de recombinación. El método puede suceder *in vitro* o *in vivo*. Los sitios de recombinación funcionales se integran de forma estable en el genoma de una célula en el sitio diana. En algunos ejemplos, el polinucleótido de interés y/o la diana puede posteriormente escindirse, invertirse, o modificarse de otro modo, por ejemplo, mediante la adición de un segundo polinucleótido de interés en el sitio diana.

Se ha caracterizado el sitio de recombinación FRT mínimo de tipo silvestre y comprende una serie de dominios que incluyen la siguiente secuencia de nucleótidos 5'-AGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACT-3' (SEC ID N° 39). Los dominios del sitio de recombinación FRT mínimo comprende un par de elementos de simetría de 11 pares de bases que son los sitios de unión de FLP (nucleótidos 1-11 y 20-30 de la SEC ID N° 39); el núcleo de 8 pares de bases, o región espaciadora (nucleótidos 12-19 de la SEC ID N° 39); y, las extensiones de polipirimidina (nucleótidos 3-14 y nucleótidos 16-29 de la SEC ID N° 39). Un sitio de recombinación FRT modificado puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más alteraciones que incluyen sustituciones, adiciones, y/o deleciones en uno o más de estos dominios.

Se proporciona un sitio de recombinación FRT modificado. Un sitio de recombinación FRT modificado es una secuencia de nucleótidos que es similar pero no idéntica al sitio de recombinación FRT nativo mínimo expuesto en la SEC ID N° 39. El sitio de recombinación FRT modificado retiene la actividad biológica del sitio de recombinación FRT de tipo silvestre y comprende un sitio de recombinación funcional que lo reconoce una recombinasa FLP y capaz de una reacción de recombinación mediada por recombinasa. El sitio de recombinación FRT modificado comprende una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos en el sitio de recombinación FRT nativo mínimo. El sitio de recombinación FRT modificado comprende la SEC ID N° 21. Generalmente, los sitios de recombinación modificados tendrán al menos aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, de identidad de secuencia con el sitio de recombinación nativo mínimo sobre su longitud completa.

El sitio de recombinación FRT modificado tiene sustituciones de nucleótidos a través de la longitud completa del sitio de recombinación mínimo.

El sitio de recombinación FRT modificado tiene alteraciones en el dominio espaciador de 8 pares de bases. El dominio espaciador modificado de FRT12 se expone en la SEC ID N° 1. El sitio FRT modificado es funcional. El sitio de recombinación FRT modificado comprende la región espaciadora expuesta en la SEC ID N° 1 y comprende adicionalmente sitios de unión a FLP en elemento de simetría que corresponden a los encontrados en el sitio de recombinación FRT nativo mínimo. Véanse, las SEC ID N° 19 y 20 que muestran secuencias de elemento de simetría de tipo silvestre. El sitio de recombinación FRT modificado se expone en la SEC ID N° 21.

El sitio FRT modificado que comprende la SEC ID N° 21 se usa en combinación con el sitio FRT de tipo silvestre que comprende la SEC ID N° 39 en una composición o método de la invención.

Como se ha analizado anteriormente, el sitio de recombinación modificado es funcional. Un sitio de recombinación funcional es un sitio de recombinación que es recombinogénico con un sitio de recombinación en presencia de la recombinasa apropiada, y salvo que se indique otra cosa, un sitio de recombinación es funcional e incluye sitios de tipo silvestre, sitios modificados, variantes, y fragmentos. Los métodos para determinar si un sitio de recombinación modificado es recombinogénico son conocidos. Como se usa en este documento, un sitio de recombinación variante funcional comprende un sitio de recombinación modificado funcional.

Los sitios de recombinación empleados en los métodos son sitios diferentes. Los sitios de recombinación diferentes, o una serie de sitios de recombinación diferentes, son sitios de recombinación que son distintos entre sí porque tienen al menos una diferencia en un nucleótido. Los sitios de recombinación dentro de una serie de sitios de recombinación diferentes pueden ser recombinogénicos o no recombinogénicos con respecto unos a los otros. Recombinogénico se refiere a sitios de recombinación capaces de recombinarse con otro. Salvo que se indique otra cosa, los sitios de recombinación recombinogénicos o una serie de sitios de recombinación recombinogénicos incluyen aquellos sitios en los que la eficacia de escisión relativa de recombinación entre los sitios es mayor del 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, o mayor. Como se define en este documento, la eficacia de escisión de recombinación relativa es la eficacia de escisión en presencia de la recombinasa nativa de un primer sitio de recombinación modificado con un segundo sitio de recombinación modificado dividido por la eficacia de escisión de un par de sitios de recombinación nativos apropiados X 100%. Por ejemplo, cuando se trabaja con sitios FRT modificados, la eficacia de escisión de recombinación relativa se define como la eficacia de escisión en presencia de FLP nativa (SEC ID N° 49) de un primer sitio FRT modificado con un segundo sitio FRT modificado dividido por la

eficacia de escisión de un par de sitios FRT nativos (FRT1, SEC ID N° 39). No recombinogénico se refiere a sitios de recombinación que en presencia de la recombinasa apropiada no se recombinarán con otro, o la recombinación entre los sitios es mínima. Salvo que se indique otra cosa, los sitios de recombinación no recombinogénicos, o una serie de sitios de recombinación recombinogénicos incluyen aquellos sitios en los que la eficacia de escisión relativa de recombinación entre los sitios es inferior al 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,075, 0,005%, 0,001%.

El sitio de recombinación FRT modificado que comprende la SEC ID N° 21 está contenido en un polinucleótido con un sitio FRT que comprende la SEC ID N° 39. En un ejemplo, el polinucleótido comprende una o más unidades de expresión. Una unidad de expresión es una secuencia de nucleótidos que comprende una unidad de ADN caracterizada porque tiene un único promotor de la transcripción. Como alternativa, el polinucleótido que contiene el sitio de recombinación FRT modificado no necesita contener un promotor y/o secuencias reguladoras cadena abajo. En otros ejemplos, el polinucleótido que comprende el sitio de recombinación modificado puede diseñarse de tal modo que después de la integración en el genoma, las secuencias contenidas en el polinucleótido estén unidas de forma funcional a un promotor activo. Se reconoce que un polinucleótido puede tener elementos adicionales incluyendo, aunque sin limitación, secuencias de nucleótidos de interés, genes marcadores, sitios de recombinación, regiones de terminación, etc. Como se ilustra a continuación, el polinucleótido puede comprender casetes de transferencia, sitios diana, o cualquier parte de los mismos.

Un polinucleótido o proteína aislada o purificada, o parte biológicamente activa del mismo, está sustancial o esencialmente libre de componentes que acompañan normalmente o interaccionan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su entorno natural. Un polinucleótido o proteína aislada o purificada está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. Típicamente, un polinucleótido aislado está libre de secuencias que flanquean de forma natural los extremos 5' y/o 3' del polinucleótido en el ADN genómico del organismo del cual deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en diversos ejemplos, el polinucleótido aislado puede contener menor de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de la secuencia de nucleótidos que flanquea de forma natural el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la cual deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menor de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5%, o 1% en peso seco de proteína contaminante. Cuando la proteína a parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, generalmente el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5%, o 1% (en peso seco) de precursores químicos o agentes químicos no de la proteína de interés.

Los polinucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen moléculas tanto de origen naturales como análogos sintéticos. Los polinucleótidos también abarcan todas las formas de secuencias incluyendo, aunque sin limitación, formas monocatenarias, formas bicatenarias, horquillas, estructuras de tronco-y-bucle, y similares.

En un ejemplo, se proporciona un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido comprende el sitio de recombinación FRT modificado que comprende la SEC ID N° 21 y un sitio FRT que comprende la SEC ID N° 39. En ejemplos específicos, el sitio de recombinación FRT modificado es la secuencia polinucleotídica. En ejemplos específicos, el sitio de recombinación FRT modificado es heterólogo al polinucleótido.

Heterólogo se refiere a un polipéptido o una secuencia de nucleótidos que es originaria de una especie diferente, o si es de la misma especie, está sustancialmente modificada a partir de su forma nativa en composición y/o locus genómico. Por ejemplo, un sitio de recombinación heterólogo es un polinucleótido que no se encuentra en el polinucleótido nativo o que no se encuentra en la misma localización en el polinucleótido nativo, y/o está modificado a partir de su composición nativa.

En otros ejemplos, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 21 y una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 39.

Un sitio de recombinación FRT modificado puede introducirse en un organismo de interés. La introducción comprende presentar al organismo al menos una molécula, composición, polinucleótido, o polipéptido, de tal modo que la composición obtenga acceso al interior de una célula. Los métodos no dependen de un método particular para introducir un polinucleótido o polipéptido en un organismo, solamente que el polinucleótido o polipéptido obtenga acceso al interior de al menos una célula del organismo.

Los organismos de interés incluyen, aunque sin limitación, organismos tanto procariotas como eucariotas incluyendo, por ejemplo, bacterias, levaduras y plantas. En un ejemplo, El organismo es una planta.

Los métodos para proporcionar o introducir una composición en diversos organismos son conocidos e incluyen, aunque sin limitación, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria, métodos mediados por virus, y reproducción sexual. Transformación estable indica que el polinucleótido introducido se integra en el genoma del organismo y es capaz de heredarse por la descendencia del mismo. Transformación transitoria indica que la composición introducida se expresa o está presente de forma solamente temporal en el organismo.

- Los protocolos para introducir polinucleótidos y polipéptidos en plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula vegetal marcada como diana para la transformación, tal como monocotiledóneas o dicotiledóneas. Los métodos adecuados para introducir polinucleótidos y polipéptidos en células vegetales y su posterior inserción en el genoma de la planta incluyen microinyección (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334; y patente de Estados Unidos 6.300.543), transformación del meristema (patente de Estados Unidos 5.736.369), electroporación (Riggs et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5602-5606), transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de Estados Unidos 5.563.055; y 5.981.840), transferencia génica directa (Paszowski et al. (1984) *EMBO J* 3:2717-2722), y aceleración de partículas balísticas (patentes de Estados Unidos 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244; 5.932.782; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlín); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926; Weissinger et al. (1988) *Ann Rev Genet* 22:421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebolla); Christou et al. (1988) *Plant Physiol* 87:671-674 (soja); Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev Biol* 27P:175-182 (soja); Singh et al. (1998) *Theor Appl Genet* 96:319-324 (soja); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4305-4309 (maíz); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); patentes de Estados Unidos 5.240.855; 5.322.783, y 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol* 91:440-444 (maíz); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature* 311:763-764; patente de Estados Unidos N° 5.736.369 (cereales); Bytebier et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5345-5349 (Litiaceae); De Wet et al. (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, Nueva York), pág. 197-209 (polen); Kaepler et al. (1990) *Plant Cell Rep* 9:415-418) y Kaepler et al. (1992) *Theor Appl Genet* 84:560-566 (transformación mediada por filamentos); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporación); Li et al. (1993) *Plant Cell Rep* 12:250-255; Christou y Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); y, Osjoda et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:745-750 (maíz mediante *Agrobacterium tumefaciens*).
- Como alternativa, los polinucleótidos pueden introducirse en plantas poniendo en contacto plantas con un virus o ácidos nucleicos virales. Generalmente, dichos métodos implican incorporar un polinucleótido dentro de una molécula de ADN o ARN viral. Se reconoce que puede sintetizarse inicialmente un polipéptido de interés como parte de una poliproteína viral, que después puede procesarse por proteólisis *in vivo* o *in vitro* para producir la proteína recombinante deseada. Además, se reconoce que los promotores también abarcan promotores utilizados para la transcripción de ARN polimerasas virales. Los métodos para introducir polinucleótidos en plantas y expresar una proteína codificada en los mismos, implicando moléculas de ADN o ARN viral, son conocidos, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 y 5.316.931.
- Los métodos de transformación transitoria incluyen, aunque sin limitación, la introducción de polipéptidos tales como la proteína recombinasa, directamente en el organismo, la introducción de polinucleótidos tales como polinucleótidos de ADN y/o ARN, y la introducción del transcrito de ARN, tal como un ARNm que codifica una recombinasa, en el organismo. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, microinyección o bombardeo de partículas. Véase, por ejemplo, Crossway et al. (1986) *Mol Gen Genet* 202:179-185; Nomura et al. (1986) *Plant Sci* 44:53-58; Hepler et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2178-2180; y, Hush et al. (1994) *J Cell Sci* 107:775-784.
- Las células que tienen la secuencia introducida pueden crecer en plantas de acuerdo con modos convencionales, véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Rep* 5:81-84. Estas plantas después pueden cultivarse, y polinizarse con la misma cepa transformada o con una cepa diferente, e identificarse la descendencia resultante que expresa la característica fenotípica deseada y/o que comprende el polinucleótido o polipéptido introducido. Pueden cultivarse dos o más generaciones para asegurar que el polinucleótido se mantiene de forma estable y se hereda, y recogerse las semillas. De este modo, se proporciona la semilla transformada, también mencionada como semilla transgénica, que tiene un polinucleótido, por ejemplo, que comprende un sitio FRT modificado, incorporado de forma estable es su genoma.
- Ejemplos de géneros y especies de plantas de interés incluyen, aunque sin limitación, monocotiledóneas y dicotiledóneas tales como maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquellas especies de *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), mijo menor (*Setaria italica*), mijo dedo (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus caslca*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europae*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avena (*Avena*), cebada (*Hordeum*), palma, legumbres incluyendo alubias y guisantes tales como guar, algarrobo, fenogreco, judías, caupí, frijol chino, frijol de Lima, haba, lentejas, garbanzo, y ricino, *Arabidopsis*, verduras, plantas ornamentales, hierbas, coníferas; plantas de cultivo y grano que proporcionan semillas de interés, plantas oleaginosas, y otras plantas leguminosas. Las verduras incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), frijol de Lima

(*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.), y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), melón cantalupo (*C. cantalupensis*), y melón (*C. melo*). Las plantas ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemo. Las coníferas incluyen, por ejemplo, pinos tales como pino taeda (*Pinus taeda*), pino ellioti (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino contorta (*Pinus contorta*), y pino de Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cicutita occidental (*Tsuga canadensis*); abeto sitka (*Picea glauca*); secoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como abeto plateado (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*).

El término planta incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido celular vegetal a partir de los cuales pueden regenerarse plantas, callos de plantas, matas de plantas, y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, óvulos, semillas, flores, huesos, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas radiculares, anteras, y similares.

También pueden usarse células procariotas en los métodos. Los procariotas incluyen diversas cepas de *E. coli*; sin embargo, también pueden usarse otras cepas microbianas incluyendo, por ejemplo, *Bacillus* sp., *Salmonella*, y *Agrobacterium*. Cepas ejemplares de *Agrobacterium* incluyen C58c1 (pGUSINT), Agt121 (pBUSINT), EHA101 (pMTCA23GUSINT), EHA105 (pMT1), LBA4404 (pTOK233), GU2260, BU3600, AGL-1, y LBA4402. Dichas cepas se describen en detalle en Chan et al. (1992) *Plant Cell Physiol* 33:577; Smith et al. (1995) *Crop Sci* 35:301; y Hiei et al. (1994) *Plant J* 6:271-282. Cepas bacterianas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, C600 (ATCC 23724), C600hfl, DH1 (ATCC 33849), DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$ F', ER1727, GM31, GM119 (ATCC 53339), GM2163, HB101 (ATCC 33694), JM83 (ATCC 35607), JM101 (ATCC 33876), JM103 (ATCC 39403), JM105 (ATCC 47016), JM107 (ATCC 47014), JM108, JM109 (ATCC 53323), JM110 (ATCC 47013), LE392 (ATCC 33572), K802 (ATCC 33526), NM522 (ATCC 47000), RR1 (ATCC 31343), X1997 (ATCC 31244), e Y1088 (ATCC 37195). Véase también, Jendrisak et al. (1987) *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, 359-371, Hanahan et al. (1983) *J Mol Biol* 166:557-580, Schatz et al. (1989) *Cell* 59:1035, Bullock et al. (1987) *Bio-Techniques* 5:376-378, ATCC Bacteria and Bacteriophages (1996) 9ª Edición, y Palmer et al. (1994) *Gene* 143:7-8.

Cepas virales ejemplares pero no limitantes incluyen, aunque sin limitación, geminivirus, begomovirus, curtovirus, mastrevirus, virus ARN de cadena (-), virus ARN de cadena (+), potyvirus, potexvirus, tobamovirus, u otros virus ADN, nanovirus, viroides, y similares, por ejemplo, el virus del mosaico africano de mandioca (ACMV) (Ward et al. (1988) *EMBO J* 7: 899-904 y Hayes et al. (1988) *Nature* 334:179-182), virus del mosaico rayado de la cebada (BSM) (Joshi et al. (1990) *EMBO J* 9: 2663-2669), virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Gronenborn et al. (1981) *Nature* 294:773-776 y Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514), virus de las estrías del maíz (MSV) (Lazarowitz et al. (1989) *EMBO J* 8:1023-1032 y Shen et al. (1994) *J Gen Virol* 76:965-969), virus del mosaico del tabaco (TMV) (Takamatsu et al. (1987) *EMBO J* 6:307-311 y Dawson et al. (1989) *Virology* 172:285-292), virus del mosaico dorado del tomate (TGMV) (Elmer et al. (1990) *Nucleic Acids Res* 18:2001-2006), y virus del enanismo del trigo (WDV) (Woolston et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6029-6041) y derivados de los mismos. Véase también, Porat et al. (1996) *Mol Biotechnol* 5:209-221.

Las secuencias de control procariotas habitualmente usadas incluyen promotores para el inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de unión al ribosoma, incluyen promotores habitualmente usados tales como los sistemas promotores de la beta lactamasa (penicilinasa) y la lactosa (lac) (Chang et al. (1977) *Nature* 198:1056), el sistema promotor del triptófano (trp) (Goeddel et al. (1980) *Nucleic Acids Res* 8:4057) y el promotor P L derivado de lambda y el sitio de unión al ribosoma del gen N (Shimatake et al. (1981) *Nature* 292:128).

El vector se selecciona para permitir la introducción en la célula hospedadora apropiada. Los vectores bacterianos son típicamente de origen plasmídico o fágico. Las células bacterianas apropiadas se infectan con partículas de vector fágico o se transfectan con ADN desnudo de vector fágico. Si se usa un vector plasmídico, las células bacterianas se transfectan con el ADN del vector plasmídico. Están disponibles sistemas de expresión procariotas/bacterianos para la expresión de una proteína usando *Bacillus* sp. y *Salmonella* (Palva et al. (1983) *Gene* 22:229-235; Mosbach et al. (1983) *Nature* 302:543-545). También pueden emplearse el operón Tet y el operón Lac.

Se conoce una diversidad de sistemas de expresión eucariotas tales como levaduras, líneas celulares de insecto, células vegetales y de mamífero, para la expresión de un polinucleótido de interés. En algunos ejemplos, se emplean células vegetales transformadas/transfectadas como sistemas de expresión. La síntesis (introducción/expresión) de secuencias de nucleótidos heterólogas en levaduras es bien conocida (Sherman et al. (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory). Dos levaduras ampliamente utilizadas para la producción de proteínas eucarióticas son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Vectores, cepas, y protocolos para la expresión en *Saccharomyces* y *Pichia* son conocidos y están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, InVitrogen). Los vectores adecuados habitualmente tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo la 3-fosfoglicerato quinasa o la alcohol oxidasa, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee.

Los baculovirus recombinantes se generan insertando las secuencias de interés particulares en el genoma de baculovirus usando protocolos establecidos con vectores y reactivos de proveedores comerciales (por ejemplo, InVitrogen, Life Technologies Incorporated). Los vectores comerciales están fácilmente disponibles con diversos promotores, tales como la polihedrina y p10, secuencias señal opcionales para la secreción de proteínas, o marcas de afinidad, tales como 6X histidina. Estos virus recombinantes se cultivan, mantienen y propagan en líneas celulares disponibles en el mercado derivadas de varias especies de insecto incluyendo *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Las células de insecto pueden cultivarse usando protocolos bien establecidos en una diversidad de medios diferentes, por ejemplo, con y sin suplementación con suero bovino. Las células cultivadas se infectan con los virus recombinantes y se expresa la secuencia de interés. Las proteínas expresadas con el sistema de baculovirus se han caracterizado extensivamente y, en muchos casos, sus modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, acilación, etc., son idénticas a la proteína expresada de forma nativa.

El sitio de recombinación FRT modificado de la invención, en combinación con FRT1 puede usarse como reactivos en kits. Dichos kits pueden comprender adicionalmente una recombinasa FLP, y pueden comprender adicionalmente un polinucleótido, opcionalmente integrado en el genoma de un organismo, que tiene al menos un sitio diana flanqueado por un sitio de recombinación FRT modificado, no recombinogénico, diferente, funcional. Cualquier kit puede estar adicionalmente acompañado por instrucciones de uso.

Los sitios de recombinación FRT modificados recombinogénicos pueden usarse en diversos métodos de recombinación específica de sitio *in vitro* e *in vivo* que permiten la integración, intercambio, modificación, alteración, escisión, inversión, y/o expresión dirigida de una secuencia de nucleótidos de interés, véanse, por ejemplo, los documentos WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855, y WO99/25853.

Los métodos emplean un sistema de recombinación específica de sitio. Una recombinasa específica de sitio, también mencionada como recombinasa, es un polipéptido que cataliza la recombinación conservativa específica de sitio entre sus sitios de recombinación compatibles, por lo tanto una recombinasa incluye polipéptidos nativos así como variantes y/o fragmentos que retienen la actividad, y polinucleótidos nativos y variantes y/o fragmentos que codifican una recombinasa que retiene la actividad. La recombinasa usada en los métodos puede ser una recombinasa nativa o una fragmento biológicamente activo o variante de la recombinasa. Un polipéptido o polinucleótido nativo comprende una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de origen natural. Para revisiones de recombinasas específicas de sitio, véase Sauer (1994) *Curr Op Biotechnol* 5:521-527; y Sadowski (1993) *FASEB* 7:760-767. Las recombinasas útiles en los métodos y composiciones incluyen recombinasas de las familias Integrasa y Resolvasa, variantes biológicamente activas y fragmentos de las mismas, y cualquier otra enzima de origen natural o producida de forma recombinante o variante de la misma, que catalice la recombinación conservativa específica de sitio entre sitios de recombinación de ADN específicos.

La familia Integrasa de recombinasas tiene más de cien miembros e incluye, por ejemplo, FLP, Cre, integrase lambda, y R. Para otros miembros de la familia Integrasa véase, por ejemplo, Esposito et al. (1997) *Nucleic Acids Res* 25:3605-3614 y Abremski et al. (1992) *Protein Eng* 5:87-91. Otros sistemas de recombinación incluyen, por ejemplo, el bacteriófago de estreptomicetes phi C31 (Kuhstoss et al. (1991) *J Mol Biol* 20:897-908); el sistema de recombinación específica de sitio SSV1 de *Sulfolobus shibatae* (Maskhelishvili et al. (1993) *Mol Gen Genet* 237:334-342); y un sistema de integración basado en la integrasa retroviral (Tanaka et al. (1998) *Gene* 17:67-76). Algunas recombinasas no requieren cofactores o un sustrato superenrollado. Dichas recombinasas incluyen la Cre nativa (SEC ID N° 45 y 46), la FLP nativa (SEC ID N° 48 y 49), o variantes activas o fragmentos de las mismas (SEC ID N° 47 y 50).

La recombinasa FLP se usa en el método de la invención. La recombinasa FLP es una proteína que cataliza una reacción específica de sitio que está implicada en amplificar la cantidad de copias del plásmido dos micras de *S. cerevisiae* durante la replicación del ADN. La recombinasa FLP cataliza recombinación específica de sitio entre dos sitios FRT. La proteína FLP se ha clonado y expresado (Cox (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4223-4227). La recombinasa FLP para su uso en los métodos y con las composiciones puede obtenerse del género *Saccharomyces*. También puede sintetizarse un polinucleótido que comprenda la recombinasa usando codones preferidos de plantas para la expresión óptima en una planta de interés. Se conoce una enzima FLP recombinante codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende codones preferidos de maíz (FLPm) que cataliza eventos de recombinación específica de sitio (SEC ID N° 50, y patente de Estados Unidos 5.929.301). Se conocen variantes y fragmentos funcionales adicionales de FLP (Buchholz et al. (1998) *Nat Biotechnol* 16:617-618, Hartung et al. (1998) *J Biol Chem* 273:22884-22891, Saxena et al. (1997) *Biochim Biophys Acta* 1340:187-204, y Hartley et al. (1980) *Nature* 286: 860-864).

La recombinasa Cre de bacteriófago cataliza la recombinación específica de sitio entre dos sitios lox. La recombinasa Cre es conocida (Guo et al. (1997) *Nature* 389:40-46; Abremski et al. (1984) *J Biol Chem* 259:1509-1514; Chen et al. (1996) *Somat Cell Mol Genet* 22:477-488; Shaikh et al. (1977) *J Biol Chem* 272:5695-5702; y, Buchholz et al. (1998) *Nat Biotechnol* 16:617-618). Las secuencias polinucleotídicas de Cre también pueden sintetizarse usando codones preferidos de plantas, por ejemplo dichas secuencias (moCre) se describen en el documento WO 99/25840 y se exponen en la SEC ID N° 47.

Una recombinasa quimérica es una proteína de fusión recombinante que es capaz de catalizar la recombinación específica de sitio entre sitios de recombinación que son originarios de diferentes sistemas de recombinación. Se describen métodos para la producción y uso de dichas recombinasas quiméricas o variantes o fragmentos activos de las mismas en el documento WO 99/25840. Se conocen ensayos para la actividad recombinasa y generalmente miden la actividad global de la enzima sobre sustratos de ADN que contienen sitios de recombinación. Por ejemplo, para ensayar la actividad FLP, puede detectarse la inversión de una secuencia de ADN en un plásmido circular que contiene dos sitios FRT invertidos como un cambio en la posición de los sitios para la enzima de restricción. Este ensayo se describe en Vetter et al. (1983) PNAS 80:7284. Como alternativa, puede ensayarse la escisión de ADN de una molécula o la frecuencia de recombinación intermolecular inducida por la enzima, como se describe, por ejemplo, en Babineau et al. (1985) J Biol Chem 260:12313; Meyer-Leon et al. (1987) Nucleic Acid Res 15:6469; y Gronostajski et al. (1985) J Biol Chem 260:12328. Como alternativa, la actividad recombinasa también puede ensayarse por escisión de una secuencia flanqueada por sitios FRT recombinogénicos que después de su retirada activarán un gen marcador que se puede ensayar. Pueden usarse estrategias de ensayo similares para Cre u otras enzimas recombinasa.

Los polinucleótidos y proteínas variantes también abarcan secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y/o recombinogénico tal como arrastre de ADN. Con dicho procedimiento, pueden manipularse uno o más secuencias codificantes de recombinasa diferentes para crear una nueva proteína recombinasa que tiene las propiedades deseadas. De este modo, se generan bibliotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos relacionados que comprende regiones de secuencia que tienen identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse de forma homóloga *in vitro* o *in vivo*. Se conocen estrategias para dicho arrastre de ADN e incluyen, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nat Biotech 15:436-438; Moore et al. (1997) J Mol Biol 272: 336-347; Zhang et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; y patentes de Estados Unidos 5.605.793 y 5.837.458.

Los métodos y composiciones emplean los sitios FRT modificados proporcionados en este documento, FRT12 (SEC ID N° 21), en combinación con FRT1 (SEC ID N° 39). Un sitio de recombinación es cualquier polinucleótido nativo o sintético/artificial que se reconoce por la enzima recombinasa de interés. Se conocen muchos sistemas de recombinación así como el sitio o sitios de recombinación apropiados a usar con el sistema de recombinación de interés, incluyendo variantes y fragmentos biológicamente activos de sitios de recombinación. Pueden usarse sitios de recombinación adicionales con la combinación FRT12/FRT1 de la invención. Se conocen ejemplos de sitios de recombinación para su uso e incluyen sitios FRT incluyendo el sitio FRT nativo (FRT1, SEC ID N° 39), y diversas variantes funcionales de FRT, incluyendo, aunque sin limitación, FRT5 (SEC ID N° 40), FRT6 (SEC ID N° 41), FRT7 (SEC ID N° 42), FRT87 (SEC ID N° 24), y los otros sitio FRT modificados funcionales. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 03/054189, WO 02/00900, WO 01/23545, y Schlake et al. (1994) Biochemistry 33:12745-12751.

También pueden usarse sitios de recombinación del sistema Cre/Lox de recombinación específica de sitio además de la combinación FRT12/FRT1 de la invención. Dichos sitios de recombinación incluyen, por ejemplo, sitios LOX nativos y diversas variantes funcionales de LOX. Se presenta un análisis de la actividad de recombinación de sitios LOX variantes en Lee et al. (1998) Gene 216:55-65 y en la patente de Estados Unidos 6.465.254. Véase también, por ejemplo, Schlake y Bode (1994) Biochemistry 33: 12746-12751; Huang et al. (1991) Nucleic Acids Res 19:443-448; Sadowski (1995) En Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology Vol. 51, pág. 53-91; patente de Estados Unidos 6.465.254; Cox (1989) En Mobile DNA, Berg and Howe (eds) American Society of Microbiology, Washington D.C., pág. 116-670; Dixon et al. (1995) Mol Microbiol 18:449-458; Umlauf y Cox (1988) EMBO J 7:1845-1852; Buchholz et al. (1996) Nucleic Acids Res 24:3118-3119; Kilby et al. (1993) Trends Genet 9:413-421; Rossant y Geagy (1995) Nat Med 1:592-594; Albert et al. (1995) Plant J 7:649-659; Bayley et al. (1992) Plant Mol Biol 18:353-361; Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223:369-378; Dale y Ow (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:10558-10562; Qui et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:1706-1710; Stuurman et al. (1996) Plant Mol Biol 32:901-913; Dale et al. (1990) Gene 91:79-85; y documento WO 01 /111058.

Puede utilizarse cualquier sitio de recombinación o serie de sitios de recombinación adecuada en métodos y composiciones además de la combinación FRT12/FRT1 de la invención, incluyendo un sitio FRT, una variante funcional de un sitio FRT, un sitio LOX, y una variante funcional de un sitio LOX, cualquier combinación de los mismos, o cualquier otra combinación de sitios de recombinación conocidos.

Directamente repetidos indica que los sitios de recombinación en una serie de sitios de recombinación recombinogénicos están dispuestos en la misma orientación, de modo que la recombinación entre estos sitios provoque la escisión, en lugar de inversión, de la secuencia de ADN intermedia. Sitio o sitios de recombinación invertidos indica que los sitios de recombinación en una serie de sitios de recombinación recombinogénicos están dispuestos en la orientación opuesta, de modo que la recombinación entre estos sitios provoca la inversión, en lugar de escisión, de la secuencia de ADN intermedia.

El sitio diana y el casete de transferencia usados en el método de la invención comprende un primer sitio de recombinación que comprende la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de recombinación que comprende la SEC ID N°



39. La recombinasa específica de sitio usada será una recombinasa FLP o se proporcionará una variante activa de la misma. Del mismo modo, cuando se utilizan también sitios Lox, puede usarse una recombinasa Cre o variante activa de la misma también. Si la serie de sitios de recombinación funcionales comprende ambos sitios FRT12 y FRT1 y un sitio Lox, puede usarse una recombinasa quimérica FLP/Cre o una variante activa o ambas recombinasas FLP y Cre o variantes activas de las mismas.

Proporcionar incluye cualquier método que permita reunir un polipéptido y/o un polinucleótido tal como una recombinasa, sitio diana, casete de transferencia, polinucleótido de interés con los componentes indicados. Por ejemplo, puede proporcionarse una célula con estos diversos componentes mediante una diversidad de métodos incluyendo métodos de transformación transitoria y estable; co-introduciendo una recombinasa de ADN, ARNm o proteína directamente en la célula; empleando un organismo, célula, cepa o línea que exprese la recombinasa para la transformación inicial; o haciendo crecer/cultivando el organismo que porta el sitio diana y cruzándolo con un organismo que exprese una proteína recombinasa activa y seleccionando acontecimientos en la descendencia. Puede usarse cualquier promotor, incluyendo un promotor constitutivo, inducible, regulado con el desarrollo/temporal, o regulado espacialmente capaz de regular la expresión en el organismo de interés para expresar la recombinasa apropiada.

Se proporcionan composiciones que comprenden un sitio de recombinación FRT modificado recombinogénico. El polinucleótido de la invención, que comprende el sitio de recombinación FRT modificado recombinogénico FRT12 (SEC ID N° 21) y FRT1 de tipo silvestre (SEC ID N° 39) puede usarse en métodos de recombinación específica de sitio.

Los métodos pueden emplear sitios diana y casetes de transferencia para permitir la manipulación, intercambio, escisión, alteración, inversión y/o introducción de una secuencia de nucleótidos *in vivo* o *in vitro*. Un sitio diana comprende al menos un sitio de recombinación. En ejemplos específicos, el sitio diana comprende un polinucleótido que está inmediatamente flanqueado por al menos dos sitios de recombinación, incluyendo series de sitios de recombinación funcionales que son diferentes y no recombinogénicos con respecto unos de otros; correspondientes y recombinogénicos con respecto unos de otros; o diferentes y recombinogénicos con respecto unos de otros. Puede estar presente una o más secuencias intermedias entre los sitios de recombinación del sitio diana. Las secuencias intermedias de particular interés incluyen enlazadores, adaptadores, regiones reguladoras, intrones, sitios de restricción, potenciadores, aisladores, marcadores de selección, secuencias de nucleótidos de interés, promotores, y/u otros sitios que ayudan a la construcción o análisis del vector. Se reconoce adicionalmente que un sitio de recombinación puede estar contenido dentro de la secuencia de nucleótidos de interés incluyendo intrones, secuencia codificante, UTR 5', UTR 3', y/o regiones reguladoras.

En ejemplos específicos, el sitio diana está en una célula o un organismo de interés. En otros ejemplos, el sitio diana está integrado de forma estable en el genoma de la célula o el organismo de interés. Se reconoce que la célula o el organismo puede comprender múltiples sitios diana, que pueden estar localizados en uno o múltiples loci dentro o por todos los cromosomas. Están disponibles múltiples manipulaciones independientes de cada sitio diana en el organismo. Además, el sitio diana también puede comprender un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una recombinasa apropiada. En otro ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la recombinasa está integrada de forma estable en el genoma del organismo.

Los métodos emplean adicionalmente casetes de transferencia. Un casete de transferencia comprende al menos un sitio de recombinación. En ejemplos específicos, el casete de transferencia comprende un polinucleótido flanqueado por al menos un primer sitio de recombinación y un segundo sitio de recombinación, donde el primer y segundo sitios de recombinación corresponden a los sitios de recombinación en el sitio diana. El primer y el segundo sitios de recombinación funcionales del casete de transferencia puede ser diferentes y no recombinogénicos con respecto uno del otro. Cuando un sitio diana y un casete de transferencia que comprende sitios de recombinación compatibles y la recombinasa se combinan, la secuencia de nucleótidos entre los sitios de recombinación del sitio diana se intercambiará con la secuencia de nucleótidos entre los sitios de recombinación del casete de transferencia. Flanqueado por, cuando se usa en referencia a la posición de los sitios de recombinación del sitio diana o el casete de transferencia, se refiere a una posición inmediatamente adyacente a la secuencia pretendida a intercambiar o insertar.

El casete de transferencia puede comprender adicionalmente un polinucleótido de interés. Los sitios de recombinación puede estar directamente contiguos al polinucleótido de interés o puede haber una o más secuencias intermedias presentes entre uno o ambos extremos del polinucleótido de interés y los sitios de recombinación. Las secuencias intermedias de particular interés incluyen enlazadores, adaptadores, potenciadores, intrones, aisladores, sitios de restricción, marcadores de selección, polinucleótidos de interés, promotores, y/o otros sitios que ayudan en la construcción o análisis del vector. Los sitios de recombinación pueden estar contenidos dentro del polinucleótido de interés incluyendo dentro de intrones, secuencia codificante, y/o regiones no traducidas 5' y 3'.

En el método de la invención, el casete de transferencia y el sitio diana comprende un sitio de recombinación FRT modificado funcional que comprende la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de recombinación que comprende la SEC ID N° 39.

Puede usarse cualquier medio para reunir los diversos componentes del sistema de recombinación. Por ejemplo, en sistemas *in vitro*, la recombinasa y el o los polinucleótidos que comprende los sitios de recombinación puede proporcionarse mediante el contacto de los componentes en las condiciones apropiadas para permitir un acontecimiento de recombinación. Como alternativa, se conoce una diversidad de métodos para la introducción de secuencias de nucleótidos y polipéptidos en un organismo incluyendo, por ejemplo, transformación, y la introducción del polipéptido, ADN, o ARNm en la célula. Véase también, el documento WO99/25884.

Los métodos encuentran uso en diversas aplicaciones. Por ejemplo, los métodos pueden emplear el uso de dos sitios de recombinación FRT funcionales modificados y permitir *in vivo* e *in vitro* el intercambio, inserción, inversión, o escisión de una secuencia de nucleótidos de interés. Por ejemplo, la célula o el organismo de interés puede comprender un primer polinucleótido que comprende un sitio diana que comprende un primer sitio de recombinación FRT modificado funcional. A la célula o el organismo se le proporciona un segundo polinucleótido que comprende un casete de transferencia que comprende un segundo sitio de recombinación FRT correspondiente y funcional o un segundo sitio FRT diferente que es recombinogénico con respecto al primer sitio. Se proporciona una recombinasa FLP en condiciones que permiten un acontecimiento de recombinación. El acontecimiento de recombinación entre los dos sitios de recombinación recombinogénicos provoca la inserción del casete de transferencia junto con el segundo polinucleótido completo que está contenido en el primer polinucleótido. En algunos ejemplos, el primer polinucleótido se integra de forma estable en el genoma del organismo. El método también puede emplearse en un contexto *in vitro*. Por ejemplo, el primer y el segundo polinucleótidos pueden comprender polinucleótidos tales como plásmidos combinados *in vitro* en presencia de una recombinasa apropiada. En este ejemplo, un acontecimiento de recombinación producirá un plásmido co-integrante. Dichos métodos encuentran uso, por ejemplo, en diversas tecnologías de clonación, incluyendo amplificación por PCR de fragmentos (Sadowski et al. (2003) BMC Biotechnol 18:9), vectores de clonación (Snaith et al. (1995) Gene 166:173-174 y patentes de Estados Unidos 6.140.129, 6.410.317, 6.355.412, 5.888.732, 6.143.557, 6.171.861, 6.270.969, y 6.277.608) y vectores virales (patente de Estados Unidos 6.541.245).

En otros ejemplos, el método comprende proporcionar un sitio diana que tiene un primer y un segundo sitio de recombinación funcional, donde el primer y el segundo sitios de recombinación son diferentes y no recombinogénicos con respecto al otro y al menos uno del primer o el segundo sitios de recombinación comprende un sitio de recombinación FRT modificado funcional descrito en este documento; proporcionar un casete de transferencia que comprende un polinucleótido de interés flanqueado por el primer y el segundo sitio de recombinación; y, proporcionar una recombinasa. La recombinasa reconoce y lleva a cabo la recombinación en el primer y el segundo sitios de recombinación.

En ejemplos específicos, el sitio diana está en una célula u organismo hospedador; y, en otros ejemplos, el sitio diana está integrado de forma estable en el genoma de la célula o el organismo hospedador. En otros ejemplos más, el sitio diana comprende un polinucleótido de interés. En este ejemplo, si el sitio diana y el casete de transferencia comprenden el primer y el segundo sitios de recombinación que son diferentes y no recombinogénicos con respecto al otro, la secuencia de interés en el sitio diana se intercambia por un segundo polinucleótido de interés contenido en el casete de transferencia.

En algunos ejemplos pueden emplearse múltiples promotores para regular la transcripción en un único sitio diana. En este caso, el sitio diana que comprende el primer y el segundo sitios de recombinación está flanqueado por dos promotores convergentes. Promotores convergentes se refiere a promotores que están orientados en cualquier extremo del sitio diana. Puede usarse el mismo promotor, o diferentes promotores en el sitio diana. Cada uno de los promotores convergentes está unido de forma funcional a cualquiera del primero o el segundo sitio de recombinación. Por ejemplo, el sitio diana flanqueado por los promotores convergentes puede comprender  $P1 \rightarrow : R1 - R2 : \leftarrow P2$ , donde P es un promotor, la flecha indica la dirección de transcripción, R es un sitio de recombinación, y los dos puntos indica que los componentes están unidos de forma funcional.

El casete de transferencia empleado con el sitio diana que tiene los promotores convergentes puede comprender, en el siguiente orden, el primer sitio de recombinación, un primer polinucleótido de interés orientado en la dirección 5' a 3', un segundo polinucleótido de interés orientado en la dirección 3' a 5', y un segundo sitio de recombinación. La inserción del casete de transferencia en el sitio diana provoca que el primer polinucleótido de interés esté unido de forma funcional al primer promotor convergente, y que el segundo polinucleótido de interés esté unido de forma funcional al segundo promotor convergente. La expresión del primer y/o el segundo polinucleótido de interés puede aumentarse o disminuirse en la célula u organismo. La expresión del primer y/o el segundo polinucleótido de interés también puede regularse independientemente dependiendo de los promotores que se usen. Se reconoce que los sitios diana pueden estar flanqueados por otros elementos que influyen en la transcripción. Por ejemplo, elementos aisladores pueden flanquear el sitio diana para minimizar los efectos de posición. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos N° 2005/0144665.

Puede usarse cualquier promotor, y se selecciona típicamente en base al resultado deseado. Un promotor es una región de ADN implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor de plantas es un promotor capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal, para

una revisión de promotores de plantas véase Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol* 40:1-22.

Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor mínimo del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos descritos en el documento WO 99/43838 y en la patente de Estados Unidos 6.072.050; el promotor mínimo CaMV 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); de la actina del arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); de la ubiquitina (Christensen et al. (1989) *Plant Mol Biol* 12:619-632 y Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor Appl Genet* 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J* 3:2723-2730); ALS (patente de Estados Unidos 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.669.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

En algunos ejemplos, puede usarse un promotor inducible. Los promotores inducibles por patógeno inducidos después de infección por un patógeno incluyen, aunque sin limitación, aquellos que regulan la expresión de proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Véase, por ejemplo, Redolff et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; Van Loon (1985) *Plant Mol Virol* 4:111-116; documento WO 99/43819; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Mol Plant-Microbe Interact* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol Gen Genet* 2:93-98; Yang (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14972-14977; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507-2511; Warner et al. (1993) *Plant J* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; patente de Estados Unidos N° 5.750.386 (inducible por nematodos); y las referencias citadas en los mismos; y Cordero et al. (1992) *Physiol Mol Plant Path* 41:189-200 (inducible por *Fusarium*). Los promotores inducible por heridas incluyen el gen del inhibidor de la proteinasa de patata (pin II) (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:494-498); *wun1* y *wun2* (patente de Estados Unidos 5.428.148); *win1* y *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200-208); *sistemina* (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573); *WIP1* (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Lett* 323:73-76); gen *MPI* (Corderok et al. (1994) *Plant J* 6: 141-150); y similares. Pueden usarse promotores regulados por agentes químicos para modular la expresión de un gen en una planta a través de la aplicación de un regulador químico exógeno. El promotor puede ser un promotor inducible por agentes químicos, donde la aplicación del agente químico induce la expresión génica, o un promotor reprimible por agentes químicos, donde la aplicación del agente químico reprime la expresión génica. Los promotores inducibles por agentes químicos incluyen, aunque sin limitación, el promotor *ln2-2* del maíz, activado por protectores de herbicida bencenosulfonamida (De Veylder et al. (1997) *Plant Cell Physiol* 38:568-77), el promotor *GST* del maíz (*GST-II-27*, documento WO 93/01294), activado por compuestos electrófilos hidrófobos usados como herbicidas pre-emergentes, y el promotor *PR-1a* del tabaco (Ono et al. (2004) *Biosci Biotechnol Biochem* 68:803-7) activado por ácido salicílico. Otros promotores de interés regulados por agentes químicos incluyen promotores sensibles a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10421-10425; y McNellis et al. (1998) *Plant J* 14:247-257); promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina (Gatz et al. (1991) *Mol Gen Genet* 227:229-237; patentes de Estados Unidos 5.814.618, y 5.789.156).

Pueden utilizarse promotores preferidos de tejidos para dirigir la expresión potenciada de una secuencia de interés dentro de un tejido vegetal particular. Los promotores preferidos de tejidos incluyen Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol* 38:792-803; Hansen et al. (1997) *Mol Gen Genet* 254:337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res* 6:157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol* 112:1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol* 112:525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol* 112: 513-524; Lam (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:181-196; y Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J* 4:495-505.

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

Se conocen promotores preferidos de raíces e incluyen, por ejemplo, Hire et al. (1992) *Plant Mol Biol* 20:207-218 (gen de la glutamina sintasa de raíz de la soja); Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3:11-22 (glutamina sintasa (GS) citosólica expresada en raíces y nódulos radiculares de soja; Keller y Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3:1051-1061 (elemento de control específico de raíz en el gen *GRP 1.8* de judía verde); Sanger et al. (1990) *Plant Mol Biol* 14:433-443 (promotor específico de raíz de la manopina sintasa (MAS) de *A. tumefaciens*); Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2:633-641 (promotores específicos de raíz aislados de *Parasponia andersonii* y *Trema tomentosa*); Leach y Aoyagi (1991) *Plant Sci* 79:69-76 (genes inductores de raíz *rolC* y *rolD* de *A. rhizogenes*); Teeri et al. (1989) *EMBO J* 8:343-350 (genes *TR1'* y *TR2'* inducidos por heridas de *Agrobacterium*); promotor del gen *VfENOD-GRP3* (Kuster et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:759-772); y promotor *rolB* (Capana et al. (1994) *Plant Mol Biol* 25(4):681-691); gen de la faseolina (Murai et al. (1983) *Science* 23:476-482; Sengopta-Gopalen et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3320-3324). Véase también las patentes de Estados Unidos 5.837.876; 5.750.386; 5.633.363; 5.459.252; 5.401.836; 5.110.732; y 5.023.179.

Los promotores preferidos de semillas incluyen tanto promotores específicos de semillas activos durante el

desarrollo de las semillas, así como promotores de germinación de semillas activos durante la germinación de las semillas. Véase, Thompson et al. (1989) BioEssays 10:108. Los promotores preferidos de semillas incluyen, aunque sin limitación, Cim1 (mensaje inducido por citoquinas); cZ19B1 (zeína de 19 kDa del maíz); y milps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); (véase el documento WO 00/11177 y patente de Estados Unidos 6.225.529). Para dicotiledóneas, los promotores preferidos de semillas incluyen, aunque sin limitación, la  $\beta$ -faseolina de la alubia, la napina, la  $\beta$ -conglucina, la lectina de soja, la cruciferina, y similares. Para monocotiledóneas, los promotores preferidos de semillas incluyen, aunque sin limitación, la zeína de 15 kDa del maíz, la zeína de 22 kDa, la zeína gamma de 27 kDa, ceroso, de encogimiento 1, de encogimiento 2, globulina 1, oleosina, y nuc1. Véase también el documento WO 00/12733, donde se describen promotores preferidos de semillas de los genes *end1* y *end2*.

En otros ejemplos, el sitio diana se construye para que tenga múltiples series funcionales de sitios de recombinación diferentes y no recombinogénicos, incluyendo el FRT12 (SEC ID N° 21)/FRT1 (SEC ID N° 39) de la invención. Por tanto, pueden apilarse u ordenarse múltiples genes o polinucleótidos. En ejemplos específicos, este método permite el apilamiento de secuencias de interés en localizaciones precisas en el genoma de una célula o un organismo. Asimismo, una vez se ha establecido un sitio diana dentro de una célula o un organismo, pueden introducirse sitios de recombinación adicionales incorporando dichos sitios dentro del casete de transferencia. Por tanto, una vez se ha establecido un sitio diana, es posible posteriormente añadir sitios o alterar sitios a través de recombinación. Dichos métodos se describen en detalle en el documento WO 99/25821.

También puede emplearse conversión de sitios de recombinación para apilar diversos polinucleótidos en el genoma de un organismo, tal como una planta. Por ejemplo, la conversión *in vivo* de sitios de recombinación para crear nuevos sitios, en lugar de reintroducir nuevos sitios de recombinación en el organismo. Por ejemplo, la conversión de sitios de recombinación diferentes y no recombinogénicos que flanquean un marcador de selección en sitios de recombinación correspondientes facilitaría la eliminación de un marcador de selección, o permitiría la reutilización del mismo marcador de selección en futuras transformaciones, proporcionando un medio para reciclar marcadores de selección. También podría modificarse *in situ* un sitio de recombinación diferente con una frecuencia de recombinación conocida en un sitio de recombinación diferente con una frecuencia de recombinación similar o alterada. Pueden conseguirse otras modificaciones para alterar la función, similitud, o recombinogenicidad.

En otro ejemplo, se proporciona una pluralidad de copias del polinucleótido de interés al organismo, tal como una planta. En algunos ejemplos, esto se consigue por la incorporación de un replicón extracromosómico en el casete de transferencia (véase el documento WO 99/25855). En ejemplos específicos, el casete de transferencia comprende un replicón y un polinucleótido de interés flanqueado por un primer y segundo sitio de recombinación de la invención directamente repetidos, donde los sitios de recombinación son recombinogénicos con respecto uno del otro. Cuando se usa una recombinasa apropiada, el casete de transferencia flanqueado por el primer y segundo sitios de recombinación directamente repetidos se escinde del genoma del organismo, por ejemplo una planta, produciendo un replicón viable que contiene el polinucleótido de interés. La replicación de este replicón produce una cantidad mayor de copias del replicón, el polinucleótido de interés, y/o prolonga la disponibilidad del casete de transferencia dentro de la célula. Puede estar presente un tercer sitio de recombinación funcional entre el replicón y el polinucleótido de interés, donde el tercer y el primer sitios de recombinación son sitios funcionales y diferentes y no recombinogénicos con respecto uno del otro, y la presencia de la recombinasa apropiada permite la integración del polinucleótido de interés en un sitio diana flanqueado por el tercer y el primer sitios de recombinación.

Un replicón comprende una unidad extracromosómica auto-replicante. El replicón puede ser originario de un virus, plásmido o célula y tiene la capacidad de auto-replicarse. En este ejemplo, el casete de transferencia usado en el método de la invención puede comprender tanto un replicón como el polinucleótido de interés. Un casete de transferencia usado en el método de la invención puede comprender en una orientación 5' a 3' o 3' a 5': un primer sitio de recombinación funcional (FRT12; SEC ID N° 21), un replicón, un segundo sitio de recombinación funcional (FRT1; SEC ID N° 39), el polinucleótido de interés, y un tercer sitio de recombinación funcional. El primer y tercer sitio de recombinación de este casete de transferencia están directamente repetidos, son correspondientes y recombinogénicos con respecto el uno del otro, y el segundo sitio de recombinación es diferente y no recombinogénico con respecto al primer y el tercer sitios de recombinación. El casete de transferencia puede estar contenido en un ADN T. El replicón puede ser un replicón viral. Un replicón viral es cualquier ADN o ARN derivado de un virus que experimenta replicación episomal en una célula hospedadora. Contiene secuencias virales de acción en *cis* necesarias para la replicación, por ejemplo, el origen de replicación. Puede contener o no secuencias virales de acción en *trans* necesarias para la replicación. El ADN viral escindido es capaz de actuar como un replicón o intermedio de replicación, independientemente, o con factores suministrados en *trans*. El ADN viral puede codificar o no partículas virales infecciosas y además puede contener inserciones, deleciones, sustituciones, reordenamientos u otras modificaciones. El ADN viral puede contener ADN heterólogo. En este caso, ADN heterólogo se refiere a cualquier ADN no viral o ADN de un virus diferente. Por ejemplo, El ADN heterólogo puede comprender un casete de expresión para una proteína o ARN de interés.

Los replicones virales adecuados para su uso en los métodos y composiciones incluyen aquellos de geminivirus, begomovirus, curtovirus, o mastrevirus, virus ARN de cadena (-), virus ARN de cadena (+), potyvirus, potexvirus, y tobamovirus. Los replicones virales también pueden incluir aquellos de virus que tienen un genoma o intermedio de replicación de ADN circular, tal como: virus del mosaico de Abutilon (AbMV), virus del mosaico africano de

mandioca (ACMV), virus de las estrías de la banana (BSV), virus del mosaico enano de la alubia (BDMV), virus del mosaico dorado de la alubia (BGMV), virus del encrespamiento apical de la remolacha (BCTV), virus amarillo occidental de la remolacha (BWYV) y otros luteovirus, virus latente de mandioca (CLV), virus de la corrosión del clavel (CERV), virus del mosaico de la coliflor (CaMV), virus del mosaico clorificado (CSMV), virus del moteado amarillo de commelina (CoYMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus del mosaico de la dalia (DaMV), virus de las estrías de digitaria (DSV), virus del mosaico de la celedonia (FMV), viroide del enanismo del lúpulo (HSV), virus de las estrías del maíz (MSV), virus del mosaico de mirabilias (MMV), virus de las estrías de miscanthus (MiSV), virus del tubérculo enano de la patata (PSTV), virus de las estrías de panicum (PSV), virus del mosaico amarillo de la patata (PYMV), virus X de la patata (PVX), virus baciliforme del tungro del arroz (RTBV), virus del moteado clorótico de la soja (SoyCMV), virus del encrespamiento foliar de la calabaza (SqLCV), virus del bandeo de las venas de la fresa (SVBV), virus de las estrías de la caña de azúcar (SSV), virus del moteado del cardo (ThMV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico dorado del tomate (TGMV), virus del moteado del tomate (TMoV), virus de las manchas anulares del tabaco (TobRV), virus del enanismo amarillo del tabaco (TobYDV), virus del encrespamiento foliar del tomate (TLCV), virus del encrespamiento foliar amarillo del tomate (TYLCV), virus del encrespamiento foliar amarillo del tomate - Tailandia (TYLCV-t) y virus del enanismo del trigo (WDV) y derivados de los mismos. En algunos ejemplos, el replicón viral puede ser de ACMV, MSV, WDV, TGMV o TMV.

La inserción de un polinucleótido de interés en el genoma del organismo puede suceder mediante un único acontecimiento de cruce. Por ejemplo, el casete de transferencia usado en el método de la invención puede comprender un primer sitio de recombinación (FRT12; SEC ID N° 21), un replicón, un polinucleótido de interés, y un segundo sitio de recombinación (FRT1; SEC ID N° 39). El primer y segundo sitios de recombinación del casete de transferencia son recombinogénicos, diferentes o correspondientes, y directamente repetidos con respecto uno del otro. El sitio diana puede comprender un único sitio de recombinación que es recombinogénico con uno de los sitios de recombinación del casete de transferencia.

El casete de transferencia se introduce en el organismo que comprende el sitio diana. Cuando se proporciona una recombinasa apropiada, sucede un acontecimiento de recombinación entre los sitios de recombinación recombinogénicos del casete de transferencia. Este acontecimiento provoca la escisión del replicón, que puede asumir una forma circularizada. La replicación de la unidad de replicón provoca una elevada cantidad de copias del replicón en el organismo y prolonga la disponibilidad del casete de transferencia en la célula. Un segundo acontecimiento de recombinación entre los sitios de recombinación recombinogénicos del sitio diana y el casete de transferencia permite la integración estable de la unidad de replicón y el polinucleótido de interés en el sitio diana del organismo.

La invención proporciona un método para la inserción dirigida de un polinucleótido de interés. Si el polinucleótido de interés se introduce en un organismo, puede conferir diversos cambios en el organismo, particularmente plantas, incluyendo, aunque sin limitación, la modificación de la composición de ácidos grasos en la planta, la alteración del contenido de aminoácidos de la planta, la alteración de la resistencia a patógenos, y similares. Estos resultados pueden conseguirse proporcionando la expresión de productos heterólogos, la expresión aumentada de productos endógenos en plantas, o la expresión suprimida de productos endógenos en plantas.

Las categorías generales de polinucleótidos de interés incluyen, por ejemplo, aquellos genes implicados en la información, tales como genes de zinc, aquellos implicados en la comunicación, tales como quinasas, y aquellos implicados en mantenimiento, tales como proteínas de choque térmico. Categorías más específicas de transgenes incluyen, por ejemplo, secuencias que codifican rasgos para agronomía, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características del grano, carga de aceite, almidón, carbohidrato, fitato, proteínas, nutrientes, metabolismo, capacidad digerible, tamaño del hueso, carga de sacarosa, y productos comerciales. Rasgos tales como el contenido de aceite, almidón, y proteínas pueden alterarse genéticamente. Las modificaciones incluyen aumentar el contenido de ácido oleico, aceites saturados e insaturados, aumentar los niveles de lisina y azufre, proporcionar aminoácidos esenciales, y también la modificación del almidón. Se describen modificaciones en la proteína hordotionina para alterar los niveles de aminoácidos en las patentes de Estados Unidos 5.703.049, 5.885.801, 5.885.802, 5.990.389. Otros ejemplos son una proteína de semillas rica en lisina y/o azufre codificada por la albúmina 2S de soja descrita en la patente de Estados Unidos 5.850.016, y el inhibidor de quimotripsina de la cebada, descrito en Williamson et al. (1987) Eur J Biochem 165:99-106.

Pueden prepararse derivados de las secuencias codificantes para aumentar el nivel de aminoácidos preseleccionados en el polipéptido codificado. Por ejemplo, polinucleótidos que codifican el polipéptido de alto contenido en lisina de la cebada (BHL) se obtienen del inhibidor de quimotripsina de la cebada (documento WO 98/20133). Otras proteínas incluyen proteínas ricas en metionina tales como de la semilla del girasol (Lilley et al. (1989) Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs, ed. Applewhite (American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois), pág. 497-502); el maíz (Pedersen et al. (1986) J Biol Chem 261:6279; Kiriara et al. (1988) Gene 71:3); y el arroz (Musumura et al. (1989) Plant Mol Biol 12:123).

Los polinucleótidos de resistencia a insectos pueden codificar resistencia a plagas tales como el gusano de la raíz, la oruga cortadora, barrenador europeo del maíz, y similares. Dichos polinucleótidos incluyen, por ejemplo, genes de la proteína tóxica de *Bacillus thuringiensis* (patentes de Estados Unidos 5.366.892; 5.747.450, 5.737.514; 5.723.756;

5.593.881; y Geiser et al. (1986) Gene 48:109; y similares.

Los polinucleótidos que codifican rasgos de resistencia a enfermedades incluyen genes de destoxificación, tales como contra la fumonisina (patente de Estados Unidos 5.792.931); avirulencia (*avr*) y genes de resistencia (*R*) a enfermedades (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; y Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); y similares.

Los rasgos de resistencia a herbicidas pueden incluir genes que codifican resistencia a herbicidas que actúan inhibiendo la acción de la acetolactato sintasa (*ALS*), en particular los herbicidas de tipo sulfonilurea tales como clorosulfurón (por ejemplo, las mutaciones *S4* y/o *Hra* en *ALS*); genes que codifican resistencia a herbicidas que actúan inhibiendo la acción de la glutamina sintasa, tal como fosfinotricina o basta (por ejemplo, el gen *bar*); glifosato (por ejemplo, el gen *EPSPS* o el gen *GAT*; véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente US20040082770 y WO 03/092360) u otros genes conocidos. La resistencia a antibióticos también puede proporcionarla, por ejemplo, el gen *npII* que codifica resistencia a los antibióticos kanamicina y geneticina.

También pueden codificarse genes de esterilidad en un casete de expresión y proporcionar una alternativa al despojado físico de la inflorescencia masculina. Los ejemplos de genes usados de tal modo incluyen genes preferidos de tejido masculino y genes con fenotipos de esterilidad masculina tales como *QM*, descrito en la patente de Estados Unidos 5.683.210. Otros genes incluyen quinasas y aquellos que codifican compuestos tóxicos para el desarrollo gametofítico masculino o femenino.

También pueden codificarse rasgos comerciales en un gen o genes que podrían, por ejemplo, aumentar el contenido de almidón para la producción de etanol, o proporcionar la expresión de proteínas. Otro uso comercial de plantas transformadas es la producción de polímeros y bioplásticos tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5.602.321. Genes tales como la  $\beta$ -cetotilasa, la PHBasa (polihidroxibutirato sintasa), y la acetoacetil-CoA reductasa (véase, Schubert et al. (1988) J Bacteriol 170:5837-5847) facilitan la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA).

La reducción de la actividad de genes específicos (también conocida como silenciamiento génico, o supresión génica) es deseable por varios aspectos de ingeniería genética en plantas. Muchas técnicas de silenciamiento génico son bien conocidas incluyendo, aunque sin limitación tecnología antisentido (véase, por ejemplo, Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:8805-8809; y patentes de Estados Unidos 5.107.065; 5.453.566; y 5.759.829); co-supresión (por ejemplo, Taylor (1997) Plant Cell 9:1245; Jorgensen (1990) Trends Biotech 8:340-344; Flavell (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:3490-3496; Finnegan et al. (1994) Bio/Technology 12: 883-888; y Neuhuber et al. (1994) Mol Gen Genet 244:230-241); interferencia de ARN (Napoli et al. (1990) Plant Cell 2: 279-289; patente de Estados Unidos 5.034.323; Sharp (1999) Genes Dev 13:139-141; Zamore et al. (2000) Cell 101:25-33; Javier (2003) Nature 425:257-263; y, Montgomery et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:15502-15507), silenciamiento génico inducido por virus (Burton, et al. (2000) Plant Cell 12:691-705; y Baulcombe (1999) Curr Op Plant Bio 2:109-113); ribozimas específicas de ARN diana (Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); estructuras de horquilla (Smith et al. (2000) Nature 407: 319-320; documento WO 99/53050; documento WO 02/00904; y documento WO 98/53083); ribozimas (Steinecke et al. (1992) EMBO J 11:1525; patente de Estados Unidos 4.987.071; y, Perriman et al. (1993) Antisense Res Dev 3:253); modificación dirigida mediada por oligonucleótidos (por ejemplo, documento WO 03/076574 y documento WO 99/25853); moléculas dirigidas por dedos de Zn (por ejemplo, documento WO 01/52620; documento WO 03/048345; y documento WO 00/42219); y otros métodos o combinaciones de los métodos anteriores conocidos.

Los polinucleótidos pueden proporcionarse en una construcción de ADN. Además, en ejemplos específicos, los sitios de recombinación y/o el polinucleótido que codifica una recombinasa apropiada también están contenidos en la construcción de ADN. El casete puede incluir secuencias reguladoras 5' y 3' unidas de forma funcional al polinucleótido de interés. Como alternativa, la construcción de ADN flanqueada por el sitio de recombinación apropiado puede carecer de los elementos reguladores 5' y/o 3'. En este caso, la construcción de ADN se diseña de tal modo que en presencia de la recombinasa apropiada un acontecimiento de recombinación en el sitio diana provoque que las regiones reguladoras 5' y/o 3' estén unidas de forma funcional a las secuencias de la construcción de ADN. Pueden estar presentes secuencias intermedias entre elementos unidos de forma funcional y no alteran el enlace funcional. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional a introducir en el organismo. Como alternativa, el gen o genes adicionales pueden proporcionarse en múltiples construcciones de ADN. Dicha construcción de ADN puede proporcionarse con una pluralidad de sitios de restricción o sitios de recombinación para la inserción de la secuencia de interés a estar bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes marcadores de selección y/o de exploración.

En algunos ejemplos, la Construcción de ADN puede incluir en la dirección 5' a 3' de transcripción, una región de inicio de la transcripción y la traducción, un polinucleótido de interés, y una región de terminación de la transcripción y la traducción funcional en el organismo de interés. En otros ejemplos, la construcción de ADN comprende un polinucleótido de interés 3' a un sitio de recombinación. En este ejemplo, el sitio diana puede comprender un promotor 5' al sitio de recombinación correspondiente mediante el cual, después de la recombinación, la secuencia de nucleótidos de interés está unida de forma funcional a la secuencia promotora. Los diversos sitios de recombinación proporcionados en este documento pueden posicionarse en cualquier parte en la construcción de

ADN, incluyendo la UTR 5', UTR 3', regiones reguladoras, intrones y/o secuencia codificante.

La región de inicio de la transcripción, el promotor, puede ser nativa, análoga, foránea, o heteróloga al organismo hospedador o al polinucleótido de interés. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o como alternativa una secuencia sintética. Dichas construcciones pueden cambiar los niveles de expresión del polinucleótido de interés en el organismo. La región de terminación puede ser nativa o heteróloga con la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa o heteróloga con el polinucleótido de interés unido de forma funcional, o puede ser nativa o heteróloga con el organismo hospedador. Están disponibles regiones de terminación convenientes del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Véase también, Guerineau et al. (1991) *Mol Gen Genet* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sarrafcon et al. (1991) *Genes Dev* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:7891-7903; y Joshiet al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:9627-9639. La secuencia de nucleótidos de interés también puede ser nativa o análoga o foránea o heteróloga al organismo hospedador.

Cuado sea apropiado, el uso de codones en la secuencia de nucleótidos de interés o la recombinasa puede modificarse para la expresión en el organismo transformado. Por ejemplo, los genes pueden sintetizarse usando codones preferidos de plantas para una expresión mejorada. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) *Plant Physiol* 92:1-11 para un análisis del uso de codones preferidos de hospedador. Están disponibles métodos para sintetizar genes preferidos de plantas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.380.831, y 5.436.391, el documento WO 99/25841, y Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:477-498.

Se conocen modificaciones de secuencia adicionales para potenciar la expresión génica en un hospedador celular. Éstas incluyen la eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación falsas, señales de corte y ajuste de exones-intrones, repeticiones tipo transposón, y otras de dichas secuencias bien caracterizadas que puede ser perjudiciales para la expresión génica. El contenido de G-C de la secuencia puede ajustarse a niveles promedio para un hospedador celular dado; calculado por referencia a genes conocidos expresados en la célula hospedadora. Cuando sea posible, la secuencia se modifica para evitar estructuras previstas de ARNm secundario en horquilla.

La construcción de ADN puede contener adicionalmente secuencias líder 5'. Dichas secuencias líder pueden actuar potenciando la traducción. Los líderes de traducción son conocidos e incluyen líderes de picornavirus, por ejemplo, líder EMCV (región no codificante 5' de la encefalomiocarditis) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6126-6130); líderes de potyvirus, por ejemplo, líder TEV (virus de la corrosión del tabaco) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165:233-238), líder MDMV (virus del mosaico de enanismo del maíz) (Allison et al. (1986) *Virology* 154:9-20; y Kong et al. (1988) *Arch Virol* 143:1791-1799), y la proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353:90-94); líder no traducido del ARNm de la proteína de cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (ARN 4 de AMV) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325:622-625); líder del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Gallie et al. (1989) en *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, Nueva York), pág. 237-256); y líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81:382-385). Véase también, Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol* 84:965-968. También pueden utilizarse otros métodos o secuencias que se sabe que potencian la traducción, por ejemplo, intrones, y similares.

En la preparación de la construcción de ADN, los diversos fragmentos de ADN pueden manipularse para situar las secuencias en la orientación apropiada y, según sea apropiado, en la fase de lectura apropiada. Hacia este fin, pueden emplearse adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN u pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, la eliminación de ADN superfluo, la eliminación de sitios de restricción, o similares. Para este propósito, puede estar implicada mutagénesis *in vitro*, reparación con cebadores, restricción, hibridación, resustituciones, transiciones y/o transversiones.

Generalmente, la construcción de ADN comprenderá un gen marcador de selección para la selección de células transformadas. Los genes marcadores de selección se utilizan para la selección de células o tejidos transformados y se han analizado en detalle en otra parte en este documento, así como promotores ejemplares de interés.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Experimental

*Ejemplo de referencia 1. Generación de bibliotecas que comprenden sitios de recombinación FRT modificados.*

Se sintetizaron dos oligos degenerados complementarios que contenían secuencias FRT con las 6 posiciones espaciadoras centrales aleatoriamente mutagenizadas en Synthetic Genetics (San Diego, CA): Oligo 1: 5'-gccagcatgcaagcttgaattc-cgaagttcctactNNNNNNagaataggaactcgagatctggatccgcggaacg-3' (SEC ID N° 52); y Oligo 2: 5'-cgttccgcggatccgatctcgaagttcctattctNNNNNNagataggaactcggatccgaattcgaagcttgcgctggc-3' (SEC ID N° 53).

La región espaciadora es de 8 pb. En este experimento, la región central de 6 pb se abordó para modificación, por

tanto, los otros dos nucleótidos se mantienen inalterados. Se hibridó un pmol de oligo 1 y un pmol de oligo 2 por desnaturalización con calor a 95°C durante 2 minutos seguido de enfriamiento gradual a temperatura ambiente. Los oligos hibridados se digirieron con *EcoRI* y *BamHI* y se ligaron en los sitios *EcoRI/BamHI* de un vector derivado de pSport1 para el cual 3 bases adicionales crearon un sitio de restricción *HpaI* (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) y el vector PHP13273 que contenía un gen de resistencia a espectinomicina para crear dos bibliotecas plasmídicas de FRT modificado. Se usó una proporción molar 10:1 y 4:1 de oligo hibridado a pSport y PHP13273 para las respectivas reacciones de ligamiento. En estas condiciones de ligamiento, se descubrió que 10 de las 10 colonias picadas aleatoriamente contenían una inserción monomérica de un sitio FRT modificado. La biblioteca de FRT modificado mencionada como "biblioteca A" está en el vector pSport y porta el marcador resistente a antibiótico ampicilina. La biblioteca de FRT modificado, mencionada como "biblioteca B" está en el vector PHP13273 y porta el marcador de resistencia a antibiótico espectinomicina. Se recogió una cantidad total de 15.904 colonias para crear la biblioteca A de FRT y se recogieron 19.600 colonias para crear la biblioteca B de FRT. Esto representó una cobertura 4x de las 6 posiciones centrales ( $4^6=4096$ ) en el sitio FRT. El ADN plasmídico se aisló de estas dos bibliotecas y se usó para exploración a escala de biblioteca.

*Ejemplo de referencia 2. Exploración a escala de biblioteca para identificar sitios de recombinación FRT modificados recombinogénicos.*

Se mezcló una cantidad molar igual de ADN de cada una de las bibliotecas A y B de FRT modificado en un tubo que contenía tampón de reacción para la recombinación *in vitro* mediada por FLP. Una reacción de recombinación típica de 20 µl comprende Tris Cl 25 mM a pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, 50 fmol de ADN de la biblioteca A, 50 fmol de ADN de la biblioteca B, y 2 µl de FLP (0,07 µg/µl final). La reacción se realiza a 30°C, y se recogen alícuotas en diversos momentos puntuales. En cada momento puntual, se recogen alícuotas de 2 µl y se detiene la reacción por ebullición durante 1 min. con refrigeración gradual a temperatura ambiente. Típicamente, se recogen muestras a los 0, 2, 5, 10, 30, 60, y 90 minutos y pudieron usarse para evaluar los sitios FRT reactivos rápidos frente a lentos. Si se tomaba solamente un momento puntual, se usaba el momento puntual 90 minutos.

Las muestras de reacción se transfirieron en células *E. coli* DH5α de acuerdo con procedimientos convencionales. Se difundieron alícuotas iguales de cada mezcla de transformación en una placa conteniendo cada una ampicilina solamente, espectinomicina solamente, o conteniendo tanto ampicilina como espectinomicina. El ADN co-integrante recombinado satisfactoriamente portará ambos marcadores de selección y por tanto, después de la transferencia en *E. coli*, conferirá resistencia tanto a ampicilina como a espectinomicina.

Aquellas colonias con resistencia a ambos antibióticos se picaron y el ADN plasmídico se preparó usando el kit de preparación de ADN plasmídico en HTP de 96 pocillos Montage (Millipore, Billerica, MA EEUU). Los sitios FRT candidatos se obtuvieron por PCR usando cebadores que flanqueaban sitios FRT recombinados en el ADN co-integrado. Los cebadores de PCR usados fueron el cebador directo: 5'-gcacatacaaatggacgaacgga-3 (SEC ID N° 54) y el cebador inverso: 5'-cctcttcgctattacgccagct-3' (SEC ID N° 55). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Un ciclo: 95°C, 1 min.; 20 ciclos: 95°C, 30 segundos; 61°C, 2 min.; un ciclo: 67°C, 3 min.; Mantenimiento: 4°C. La secuencia de los sitios FRT candidatos amplificados se determinó por secuenciación de ciclo (esencialmente como se describe en Slatko et al. (1993) DNA Sequencing. En, Current Protocols in Molecular Biology, (ed. Por Ausubel et al.) Cap. 7, pág. 7.0.1-7.6.13, Nueva York: John Wiley & Sons).

*Ejemplo 3. Métodos para ensayar la eficacia de escisión de sitios de recombinación FRT modificados recombinogénicos.*

Para ensayar la eficacia de escisión mediada por recombinasa de un sitio FRT candidato, se prepararon vectores de escisión en los que se clonaron dos copias de un sitio FRT modificado recombinogénico candidato en orientación directa flanqueando la secuencia promotora de la ubiquitina del maíz en pSport (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizó una reacción de escisión en las siguientes condiciones: 3 µl de ADN del vector de escisión miniprep (2 mg/ml), 1 µl de tampón 10x (Tris Cl 250 mM a pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 50 mM), 5 µl de ddH<sub>2</sub>O, y 1 µl de FLP (0,72 mg/ml). La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 30 min., se hirvió durante 2 min., se enfrió a temperatura ambiente, se digirió con *EcoRV* y *XhoI*, y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa.

*EcoRV* genera un único corte en la estructura del vector pSport mientras que *XhoI* genera un único corte en la secuencia del promotor de la ubiquitina del maíz. La doble digestión del vector de escisión no recombinado produce dos fragmentos de 4332 pb y 769 pb. La doble digestión del vector de producto después de tener lugar la escisión produce un fragmento adicional de 952 pb. Los fragmentos de ADN se cuantificaron usando el software Quantity One de Bio-Rad Laboratories. Según sucede la escisión, se produce una cantidad aumentada del fragmento de 952 pb y se produce menos del fragmento de 769 pb. Por tanto, la proporción del fragmento de 952 pb al fragmento de 769 pb mide la eficacia de escisión absoluta. En este experimento, la eficacia de escisión de recombinación relativa (% de eficacia de escisión) de un sitio FRT se calcula como la eficacia de escisión en presencia de FLP nativa de levadura de un primer sitio FRT modificado con un segundo sitio FRT modificado dividido por la eficacia de escisión de un par de sitios FRT de tipo silvestre (SEC ID N° 39) X 100%.



Se analizaron diversos sitios de recombinación FRT modificados identificados en los métodos del Ejemplo 2 para su capacidad de retener la actividad biológica. La Tabla 1 expone diversos sitios de recombinación FRT modificados funcionales y su eficacia de recombinación relativa determinada como se ha resumido anteriormente. Se incluyen datos para sitios FRT diferentes de FRT1 y FRT12 para propósitos comparativos solamente.

Tabla 1

Sitios FRT	SEC ID N° para sitio FRT modificado mínimo	Secuencia espaciadora	SEC ID N° para secuencia espaciadora modificada	Eficacia de escisión (%)
FRT1	39	TTTCTAGA	43	100
FRT12	21	TCTATGTA	1	102
FRT57	22	TTTTCTAA	2	82
FRT85	23	TTTCTTGA	3	116
FRT87	24	TTTCTGGA	4	93
FRT53	25	TGTAAAAA	5	64
FRT62	26	TTTAGGTA	6	72
FRT78	27	TGAAAAGA	7	60
FRT34	28	TGTAATGA	8	34
FRT70	29	TATACAAA	9	25
FRT76	30	TTCCATAA	10	30
FRT89	31	TCTCTAGA	11	39
FRT43	32	TTCCGAGA	12	14
FRT45	33	TCTCTTGA	13	5
FRT55	34	TCCACAGA	14	7
FRT65	35	TGATTGGA	15	18
FRT69	36	TTTTGTGA	16	9
FRT74	37	TGAGAGAA	17	5
FRT86	38	TTTCTCGA	18	12
FRT5	40	CTTTTGAA	44	15

Las secuencias espaciadoras estaban flanqueadas por el elemento simétrico de 13 pares de bases de tipo silvestre expuesto en la Figura 1.

**Ejemplo 4. Métodos para ensayar la eficacia de co-integración de sitios de recombinación FRT modificados recombinogénicos.**

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 2. En resumen, se clonaron individualmente FRT1, 5, y 6 (SEC ID N° 39, 40, y 41) en sitios *EcoRI/BamHI* de PHP13273 y el vector pSport1 modificado. Se mezclaron 50 fmol de ADN de FRT1 en PHP13273 (Spec') con 50 fmol de ADN de FRT1 en pSport1 modificado (Ap') en 20 µl de tampón de reacción que contenía Tris Cl 25 mM a pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, y 2 µl de FLP (0,07 µg/µl final). En cada momento puntual, se tomaron alícuotas de 2 µl y la reacción se detuvo por ebullición durante 1 min. con refrigeración gradual a temperatura ambiente. Las muestras de reacción se transfirieron en células de *E. coli* DH5α de acuerdo con procedimientos convencionales. Se difundieron alícuotas iguales de cada mezcla de transformación en una placa, conteniendo cada una ampicilina solamente, espectinomomicina solamente, o conteniendo tanto ampicilina como espectinomomicina. El ADN co-integrado recombinado satisfactoriamente mediante sitios FRT1 portará ambos marcadores de selección y por tanto, después de la transferencia en *E. coli*, conferirá resistencia tanto a ampicilina como a espectinomomicina. Aquellas colonias con resistencia a ambos antibióticos se picaron y el ADN plasmídico co-integrado se preparó para análisis adicional. Los clones que son resistentes a ambos antibióticos pero no albergan ADN plasmídico co-integrado se sustrajeron en el cálculo de la frecuencia de co-integración.

La frecuencia de co-integración de FRT1 se determinó calculando el porcentaje de colonias que albergan ADN plasmídico co-integrado entre las colonias resistentes a un fármaco antibiótico. Asimismo, se realizó la integración *in vitro* de FRT5 o FRT6 y se determinó la frecuencia de co-integración de FRT5 o FRT6 en consecuencia. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los datos para FRT5 y FRT6 se incluyen solamente para propósitos comparativos.

Tabla 2. Porcentaje de co-integrantes recuperados de recombinación mediada por FLP *in vitro* (%)

Tiempo (h)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
FRT1 + FRT1	0,01	0,32	0,70	0,98	1,03
FRT5 + FRT5	0,00	0,04	0,04	0,08	0,09
FRT6 + FRT6	0,02	0,20	0,18	0,28	0,27

La recombinación mediada por FLP *in vitro* se realizó como se ha descrito anteriormente. Cuando se mezcla ADN que contiene sitios FRT diferentes en la reacción, tal como en la exploración a escala de biblioteca descrita previamente, se reduce adicionalmente la recombinación intermolecular entre dos sitios FRT correspondientes. En

reacciones que contienen sitios FRT1 solamente, sitios FRT5 solamente, o sitios FRT6 solamente, la recombinación entre sitios FRT1 es aproximadamente 10 veces más eficaz que entre sitios FRT5 y aproximadamente 4 veces más eficaz que entre sitios FRT6 (Tabla 2).

- 5 En este ejemplo, se mezcló el ADN plasmídico que contiene tres sitios FRT diferentes (FRT1, FRT5, y FRT6),  
residiendo cada uno en pSport1 modificado que porta el marcador de selección Ap<sup>r</sup> y PHP13273 que porta Spec<sup>r</sup>, en  
la reacción. Entre FRT1, FRT5, y FRT6, dos sitios FRT diferentes no recombinan entre sí. En la reacción que tiene  
cantidades equimolares de ADN que contiene sitios FRT de FRT1, FRT5, y FRT6, se reduce la eficacia de  
recombinación entre dos sitios FRT correspondientes cualesquiera. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Los  
10 datos para FRT5 y FRT6 se incluyen para propósitos comparativos solamente. La frecuencia de co-integración  
combinada entre dos sitios FRT1, dos sitios FRT5, y dos sitios FRT6 fue del 0,09% después de 90 minutos,  
aproximadamente 10 veces menor que la de la reacción que tiene el sitio FRT1 solamente. La mayor parte de los co-  
integrantes es de recombinación mediante los sitios FRT más eficaces, FRT1, en la reacción como se indica por el  
hecho que los 10 co-integrados picados aleatoriamente fueron productos de recombinación de sitios FRT1. En la  
15 reacción que tiene una cantidad molar inferior de ADN que contiene el sitio FRT1 (la proporción molar entre FRT1,  
FRT5, y FRT6 es: 0,04:1,00:1,00), la recombinación global se redujo adicionalmente. Además, ninguno de los 10 co-  
integrados picados aleatoriamente fue producto de recombinación de sitios FRT1.

Tabla 3.

Sitios FRT*	Co-integrado (%)	Co-integrado FRT1/co-integrado total analizado
FRT1 (Ap <sup>r</sup> , 50 fmol) + FRT1 (Spec <sup>r</sup> , 50 fmol)	0,98	10/10
FRT5 (Ap <sup>r</sup> , 50 fmol) + FRT5 (Spec <sup>r</sup> , 50 fmol)	0,08	NA
FRT6 (Ap <sup>r</sup> , 50 fmol) + FRT6 (Spec <sup>r</sup> , 50 fmol)	0,28	NA
FRT1 (Ap <sup>r</sup> , 16 fmol) + FRT1 (Spec <sup>r</sup> , 16 fmol) + FRT5 (Ap <sup>r</sup> , 16 fmol) + FRT5 (Spec <sup>r</sup> , 16 fmol) + FRT6 (Ap <sup>r</sup> , 16 fmol) + FRT6 (Spec <sup>r</sup> , 16 fmol)	0,09	10/10
FRT1 (Ap <sup>r</sup> , 0,8 fmol) + FRT1 (Spec <sup>r</sup> , 0,8 fmol) +		
FRT5 (Ap <sup>r</sup> , 20 fmol) + FRT5 (Spec <sup>r</sup> , 20 fmol) + FRT6 (Ap <sup>r</sup> , 20 fmol) + FRT6 (Spec <sup>r</sup> , 20 fmol)	0,07	0/10

\* El marcador de selección y la cantidad molar de ADN usada en la reacción se incluyen en paréntesis.

20

#### Ejemplo 5: Transformación en plantas

##### A. Transformación por bombardeo de partículas y regeneración de callos de maíz

- 25 Se bombardean embriones inmaduros de maíz de plantas donantes High tipo II (Hill) de invernadero o cultivadas en  
campo con un polinucleótido aislado que comprende un sitio de recombinación, casete de transferencia, sitio diana,  
y/o recombinasa proporcionados en este documento. Si el polinucleótido no incluye un marcador de selección,  
puede co-precipitarse otro polinucleótido que contenga un gen marcador de selección en las partículas usadas para  
el bombardeo. Por ejemplo, puede usarse un plásmido que contenga el gen PAT (Wohlleben et al. (1988) Gene  
30 70:25-37) que confiere resistencia al herbicida Bialafos. La transformación se realiza del siguiente modo.

Las espigas se esterilizan en superficie en lejía Clorox al 50% más detergente Micro al 0,5% durante 20 minutos, y  
se aclararan dos veces con agua estéril. Los embriones inmaduros se escinden y se sitúan con el eje embrionario  
hacia abajo (escutelo hacia arriba), 25 embriones por placa. Éstos se cultivan en medio agar 560L 4 días antes del  
bombardeo en la oscuridad. El medio 560L es un medio basado en N6 que contiene vitaminas de Eriksson, tiamina,  
35 sacarosa, 2,4-D, y nitrato de plata. El día del bombardeo, los embriones se transfieren a medio 560Y durante 4 horas  
y se disponen dentro de la zona diana de 2,5 cm. El medio 560Y es un medio altamente osmótico (560L con  
elevada concentración de sacarosa).

- 40 Se construye un vector plasmídico que comprende un polinucleótido de interés unido de forma funcional al promotor  
seleccionado. Este ADN plasmídico, más ADN plasmídico que contiene un marcador de selección PAT si se  
necesita, se precipita en gránulos de oro de 1,0 µm (diámetro promedio) usando un procedimiento de precipitación  
con CaCl<sub>2</sub> del siguiente modo: se preparan 100 µl de partículas de oro (0,6 mg) en agua, 20 µl (2 µg) de ADN en  
tampón TrisEDTA (1 µg total), 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M, 40 µl de espermidina 0,1 M.

45

Cada reactivo se añade secuencialmente a la suspensión de partículas de oro. La mezcla final se sonica  
brevemente. Después del periodo de precipitación, los tubos se centrifugan brevemente, se retira el líquido, se lavan  
con 500 µl de etanol al 100%, y se centrifugan de nuevo durante 30 segundos. De nuevo se retira el líquido, y se  
añaden 60 µl de etanol al 100% al sedimento de partículas de oro final. Para el bombardeo con pistola de partículas,  
50 las partículas de oro/ADN se sonicán brevemente y se aplican puntualmente 5 µl sobre el centro de cada  
macroportador y se dejan secar aproximadamente 2 minutos antes del bombardeo.

Las placas de muestra se bombardean a una distancia de 8 cm desde la pantalla de detención al tejido, usando una pistola de partículas de helio biolística DuPont. Todas las muestras reciben un único disparo a 4,48 MPa (650 PSI), con un total de diez alícuotas tomadas de cada tubo de partículas/ADN preparadas.

- 5 De cuatro a 12 horas después del bombardeo, los embriones se mueven a 560P (un medio de inicio de callo poco osmótico similar a 560L pero con menor contenido de nitrato de plata), durante 3-7 días, después se transfieren a medio de selección 560R, un medio basado en N6 similar a 560P que contiene 3 mg/litro de Bialafos, y se subcultivan cada 2 semanas. Después de aproximadamente 10 semanas de selección, los clones de callo se muestrean para PCR y/o la actividad del polinucleótido de interés. Las líneas positivas se transfieren a medio 288J, un medio basado en MS con menores niveles de sacarosa y hormonas, para iniciar la regeneración de la planta. Después de la maduración somática del embrión (2-4 semanas), los embriones somáticos bien desarrollados se transfieren a medio para germinación y se transfieren a la estancia de cultivo iluminada. Aproximadamente 7-10 días después, las plántulas en desarrollo se transfieren a medio en tubos durante 7-10 días hasta que las plántulas están bien establecidas. Las plantas después se transfieren a insertos en cajoneras (equivalentes a macetas de 6,35 cm (2,5")) que contienen tierra abonada y se cultivan durante 1 semana en una cámara de cultivo, posteriormente se cultivan 1 - 2 semanas adicionales en el invernadero, después se transfieren a macetas Classic™ 600 (6,06 l (1,6 galones)) y se cultivan a madurez. Las plantas se controlan para la expresión del polinucleótido de interés.

#### 20 B. Transformación mediada por *Agrobacterium* y regeneración de callos de maíz

Para la transformación mediada por *Agrobacterium* del maíz, se usa un polinucleótido que comprende un sitio de recombinación, casete de transferencia, sitio diana, y/o recombinasa proporcionados en este documento con el método de Zhao (patente de Estados Unidos 5.981.840).

- 25 En resumen, se aíslan embriones inmaduros del maíz y los embriones se ponen en contacto con una suspensión de *Agrobacterium* que contiene un polinucleótido de interés, donde las bacterias son capaces de transferir la secuencia de nucleótidos de interés a al menos una célula de al menos uno de los embriones inmaduros (etapa 1: la etapa de infección). En esta etapa, los embriones inmaduros se sumergen en una suspensión de *Agrobacterium* para el inicio de la inoculación. Los embriones se co-cultivan durante un tiempo con *Agrobacterium* (etapa 2: la etapa de co-cultivo). Después de este periodo de co-cultivo, puede realizarse una etapa adicional de "reposo" (etapa 3: etapa de reposo). Los embriones inmaduros se cultivan en medio sólido con antibiótico, pero sin agente de selección, para la eliminación de *Agrobacterium* y para anafase de reposo para las células infectadas. A continuación, los embriones inoculados se cultivan en medio que contiene un agente selectivo y se recupera el callo transformado en crecimiento (etapa 4: la etapa de selección). Los embriones inmaduros se cultivan en medio sólido con un agente selectivo provocando el crecimiento selectivo de células transformadas. El callo después se regenera en plantas (etapa 5: la etapa de regeneración), y los callos cultivados en medio selectivo se cultivan en medio sólido para regenerar las plantas.

#### 40 C. Transformación de dicotiledóneas

Puede introducirse un polinucleótido que comprende un sitio de recombinación, casete de transferencia, sitio diana, y/o recombinasa proporcionados en este documento en cultivos en suspensión embriogénicos de soja por bombardeo de partículas usando esencialmente los métodos descritos en Parrott, et al. (1989) Plant Cell Rep. 7:615-617. Este método, con modificaciones, se describe a continuación.

- 45 Se retiran las semillas de las vainas cuando los cotiledones están entre 3 y 5 mm de longitud. Las semillas se esterilizan en una solución de lejía (0,5%) durante 15 minutos, tiempo después del cual las semillas se aclaran con agua destilada estéril. Los cotiledones inmaduros se escinden cortando primero la parte de la semilla que contiene el eje embrionario. Los cotiledones después se retiran de la cubierta de la semilla empujando suavemente el extremo distal de la semilla con el extremo romo de la cuchilla del escalpelo. Los cotiledones después se colocan en placas Petri (plano hacia arriba) con medio de inicio SB1 (sales MS, vitaminas B5, 20 mg/l de 2,4-D, 31,5 g/l de sacarosa, 8 g/l de Agar TC, pH 5,8). Las placas Petri se incuban en la luz (16 h día; 75-80 µE) a 26°C. Después de 4 semanas de incubación, los cotiledones se transfieren a medio SB1 fresco. Después de dos semanas adicionales, se escinden los embriones somáticos en fase globular que muestran áreas proliferativas y se transfieren a medio líquido FN Lite (Samoilov, et al. (1998) In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant 34:8-13). Se colocan aproximadamente 10 a 12 grupos pequeños de embriones somáticos en matraces de 250 ml que contienen 35 ml de medio SB172. Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja se mantienen en 35 ml de medio líquido en un agitador rotatorio, 150 rpm, a 26°C con luces fluorescentes (20 µE) en un programa de 16:8 horas día/noche. Los cultivos se sub-cultivan cada dos semanas inoculando aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de medio líquido.

- 60 Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja después se transforman usando bombardeo con pistola de partículas (Klein et al. (1987) Nature 327:70; patente de Estados Unidos N° 4.945.050). Puede usarse un instrumento BioRad Biolística PDS1000/HE para estas transformaciones. Un gen marcador de selección, que se usa para facilitar la transformación de la soja, es un gen quimérico compuesto por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812), el gen de la higromicina fosfotransferasa del plásmido pJR225 (de *E. coli*; Gritz et al. (1983) Gene 25:179-188) y al región 3' del gen de la nopalina sintasa del ADN T del plásmido

Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

A 50 µl de una suspensión de partículas de oro de 1 µm a 60 mg/ml se añade (en orden): 5 µl de ADN (1 µg/µl), 20 µl de espermidina 0,1 M, y 50 µl de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M). La preparación de partículas se agita durante tres minutos, se centrifuga en una microfuga durante 10 segundos y se retira el sobrenadante. Las partículas recubiertas con ADN se lavan una vez en 400 µl de etanol al 70% y se resuspenden en 40 µl de etanol anhidro. La suspensión de ADN/partículas se sonica tres veces durante un segundo cada una. Después se cargan cinco µl de las partículas d oro recubiertas de ADN en cada disco macro portador.

Se colocan aproximadamente 300-400 mg de un cultivo en suspensión de dos semanas en una placa petri vacía de 60x15 mm y se retira el líquido residual del tejido con una pipeta. La presión de rotura de la membrana se establece a 7,58 MPa (1100 psi) y se evacua la cámara a un vacío de 7,11 metros (28 pulgadas) de mercurio. El tejido se coloca a aproximadamente 8 cm de la pantalla de retención, y se bombardea tres veces. Después del bombardeo, el tejido se divide en mitades y se coloca de nuevo en 35 ml de medio FN Lite.

De cinco a siete días después del bombardeo, se intercambia el medio líquido con medio fresco. Once días después del bombardeo, el medio se intercambia con medio fresco que contiene 50 mg/ml de higromicina. Este medio selectivo se refresca semanalmente. De siete a ocho semanas después del bombardeo, se observará tejido transformado verde creciendo a partir de grupos embriogénicos necróticos no transformados. El tejido verde aislado se retira y se inocula en matraces individuales para generar nuevos cultivos en suspensión embriogénicos transformados, clonalmente propagados. Cada nueva línea se trata como un acontecimiento de transformación independiente. Estas suspensiones después se cubcultivan y se mantienen en forma de grupos de embriones inmaduros, o se regenera el tejido en plantas completas por maduración y germinación de embriones individuales.

D. Aislamiento de ADN de callos y tejidos foliares

Pueden explorarse acontecimientos de transformación putativos para la presencia del transgén. Se extrae el ADN genómico de callos u hojas usando una modificación del método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, Sigma H5882) descrito por Stacey e Isaac (1994 En Methods in Molecular Biology Vol. 28, pág. 9-15, Ed. P.G. Isaac, Humana Press, Totowa, NJ). Se muelen aproximadamente 100-200 mg de tejido congelado en un polvo en nitrógeno líquido y se homogeneizan en 1 ml de tampón de extracción CTAB (CTAB al 2%, EDTA 0,02 M, Tris-Cl 0,1 M pH 8, NaCl 1,4 M, DTT 25 mM) durante 30 min. a 65°C. Las muestras homogeneizadas se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 15 min. antes de hacer una única extracción de proteínas con aproximadamente 1 ml de cloroformo:octanol 24:1 v/v. Las muestras se centrifugan durante 7 min. a 13.000 rpm y se recoge la capa superior de sobrenadante usando puntas de pipeta de boca ancha. El ADN se precipita del sobrenadante por incubación en etanol al 95% en hielo durante 1 h. Las hebras de ADN se enrollan en un garfio de vidrio, se lavan en etanol al 75% que contiene acetato sódico 0,2 M durante 10 min., se secan al aire durante 5 min. y se resuspenden en tampón TE. Se añaden cinco µl de RNasa A a la muestras y se incuban a 37°C durante 1 h. Para la cuantificación del ADN genómico, se realiza electroforesis en gel usando un gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE 1x. Se fracciona un microlitro de cada una de las muestras junto con 200, 400, 600 y 800 ng µl<sup>-1</sup> de marcadores de ADN no cortado λ.

*Ejemplo 6 de referencia. Comparación de la eficacia de recombinación relativa de secuencias FRT diferentes en células de maíz.*

Se proporcionan dos ensayos que miden las tasas de activación relativa de transgenes como resultado de la escisión mediada por FLP, que pone un promotor y un transgén en proximidad funcional. El método puede usarse para caracterizar la eficacia de recombinación de sitios de recombinación correspondientes y/o diferentes y determinar de este modo si los sitios son recombinogénicos o no recombinogénicos entre sí.

A continuación se analizan dos ensayos: (A) valoración de la activación de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en células individuales y (B) valoración de la actividad luciferasa.

A. Ensayo de fluorescencia

Se introducen tres casetes de expresión transgénicos (resumidos en la Tabla 4) en un tratamiento de ensayo de FRT o un tratamiento de control.

Tabla 4.

Construcción de ensayo de FRT	Construcción de control
CPN60:FRTx:GUS:FRTx:YFP:35s term	CPN60:FRTx:YFP:35s term
Actina::CFP::nos	Actina::CFP::nos
Ubi::FLP::pinII	Ubi::FLP::pinII
YFP = proteína fluorescente amarilla; CFP = proteína fluorescente cian; CPN60 = promotor de la chaperonina 60 del maíz (Close (1993) Master's Thesis, Iowa State University).	

Tanto en el tratamiento de control como en el tratamiento de ensayo de FRT, se mezclan los tres casetes de expresión relevantes (o apropiados) en proporciones equimolares, y se introducen en células escutelares de embriones inmaduros Hi-II usando métodos convencionales de suministro de partículas. Después de dos días, se cuentan la cantidad de células fluorescentes cian y amarillas usando un estereomicroscopio epifluorescente Leica.

5 La cantidad de células fluorescentes cian se usa para normalizar entre los tratamientos proporcionando una medición relativa de cuántas células recibieron suficiente ADN para expresar los transgenes. Para validar este sistema de ensayo, se usa FRT1 para el primer experimento. Como tratamiento de control, se usa una mezcla de los siguientes tres plásmidos: Actina::Cian FP::nos, CPN60:FRT1:YFP:35s term, y Ubi::FLP::pinII. En el tratamiento de control, cuando se co-introducen estos tres plásmidos y se valoran las cantidades de células cian y amarillas dos días

10 después, se espera que las cantidades de células cian y amarillas en la población sean aproximadamente equivalentes (1:1).

En el tratamiento de ensayo de FRT, cuando se usa FRT1 en el casete activado por escisión (CPN60:FRT1:GUS:FRT1:YFP:35s term), se espera que aproximadamente el 90-95% de las células que expresan fluorescencia cian también expresen fluorescencia amarilla, es decir, la escisión de la región flanqueada por FRT1 es relativamente eficaz. En base a estudios previos con FRT5, cuando se usa FRT5 en el casete de escisión, se espera que la frecuencia de células fluorescentes cian que también expresan la proteína fluorescente amarilla baja hasta aproximadamente el 15% de la observada en el tratamiento de FRT1.

15

El casete activado por escisión también puede usarse para determinar si dos sitios de recombinación FRT diferentes son recombinogénicos o no recombinogénicos. Para determinar si FRT1 y FRT5 son recombinogénicos o no recombinogénicos con respecto uno del otro, se construye un casete activado por escisión que comprende CPN60:FRT1:GUS:FRT5:YFP:35s term. Como se resume en la Tabla 4, los tres casetes de expresión se mezclan en proporciones equimolares, y se introducen en células escutelares de embriones inmaduros Hi-II usando métodos convencionales de suministro de partículas. Después de dos días, se cuentan las cantidades de células fluorescentes cian y amarillas usando un estereomicroscopio epifluorescente Leica. La cantidad de células fluorescentes cian se usa para normalizar entre tratamientos proporcionando una medición relativa de cuántas células recibieron suficiente ADN para expresar los transgenes.

20

25

30 Cuando el casete de escisión comprende un sitio de recombinación FRT1 y FRT5, se espera que la frecuencia de células fluorescentes cian que también expresan la proteína fluorescente amarilla baje hasta aproximadamente menos del 1% de la observada cuando se emplea un casete de escisión que comprende dos sitios de recombinación FRT1. Se determina que los sitios, por lo tanto, son no recombinogénicos.

35 **B. Ensayo basado en la activación de actividad enzimática luciferasa**

El segundo sistema de ensayo de nuevo usa una mezcla de plásmidos en cantidades equimolares, cobombardados en células escutelares de embriones inmaduros Hi-II. Para este ensayo, los tres plásmidos se muestran en la Tabla 5.

40

Tabla 5

Tratamiento de ensayo FRT	Control
Actina::FRTx:GUS:FRTx:FF-luciferasa::nos *	Actina::FRTx:FF-luciferasa::nos *
Nos::luciferasa de Renilla::35S term	Nos::luciferasa de Renilla::35S term
Ubi::FLP::pinII	Ubi::FLP::pinII
* FF = luciferasa de luciérnaga; luciferasa de Renilla (Minko et al. (1999) Mol. Gen. Genet. 262:421-425)	

De nuevo, se usa FRT1 para validar el sistema de ensayo. En el tratamiento de control, se introducen Actina:FRT1:FF-luciferasa::nos, Nos::luciferasa de Renilla::35S term, y Ubi::FLP::pinII en células escutelares y después de 2 días, se extrae el tejido usando métodos y soluciones proporcionados en el kit de ensayo de doble luciferasa Promega (Promega, Madison, WI 53711). Se extraen individualmente múltiples escutelos, y los extractos se ensayan secuencialmente para la actividad luciferasa de luciérnaga y después de Renilla usando un Fluoroscan. Con esta mezcla de construcciones, se espera que la proteína luciferasa de luciérnaga expresada produzca aproximadamente 5000 unidades relativas de luz y que la luciferasa de Renilla produzca aproximadamente 15.000.

45

50 Cuando se usa FRT1 en el casete activado por escisión (Actina:FRT1:GUS:FRT1:luci de luciérnaga:35s term), se espera que la luciferasa de luciérnaga produzca aproximadamente 4500 unidades de luz (aproximadamente el 90% del tratamiento de control). Cuando se usa FRT 5 en el casete de escisión, se espera que la actividad luciferasa de luciérnaga baje hasta aproximadamente 670 unidades de luz (~15% de FRT1).

55 *Ejemplo de referencia 7. Direccionamiento de la inserción de un polinucleótido de interés en maíz.*

A. Establecimiento de una línea diana.

Para la evaluación de secuencias FRT para integración específica de sitio, primero se crea un sitio diana integrando

de forma estable un polinucleótido que comprende un sitio diana que tiene dos sitios de recombinación FRT funcionales, donde los sitios de recombinación son diferentes y no recombinogénicos con respecto uno del otro. Esta transformación inicial se consigue en germoplasma Hi-II (o líneas endogámicas) usando métodos de transformación convencionales con *Agrobacterium* para el maíz (véase Ejemplo 5B). Por ejemplo, para comparar la eficacia relativa de FRT5 y FRT87 en el sistema de integración específico de sitio, se introducen por separado las siguientes construcciones en el germoplasma Hi-II:

PHP20807:

10 RB- Ubi:Ubi-intrón:FRT1:Proteína fluorescente amarilla::pinII/Ubi:Ubi-intrón:  
GAT::pinII/ln2-1 term:GUS:FRT5:Os-Actina-intrón:Os-Actina Pro-LB

PHP20705:

15 RB- Ubi:Ubi-intrón:FRT1:Proteína fluorescente amarilla::pinII/Ubi:Ubi-intrón:  
GAT::pinII/ln2-1 term:GUS:FRT87:Os-Actina-intrón:Os-Actina Pro-LB

Los transformantes estables se seleccionan buscando callos fluorescentes amarillos que crecen en medio que contiene glifosato. Las plantas se regeneran y se envían al invernadero. Se toman muestras foliares para análisis de Southern. Se cultivan plantas transgénicas de una única copia hasta la madurez y se cruzan con Hi-II de tipo silvestre (o líneas endogámicas). Estos acontecimientos transgénicos ahora contienen el sitio diana FRT1-5 o FRT1-87, y ya están listos para recombinación mediada por recombinasa específica de sitio.

B. Introducción del casete de transferencia usando bombardeo de partículas.

25 Se usan embriones inmaduros de la línea que tiene los sitios diana como se evidencia por expresión de fluorescencia amarilla para la posterior retransformación. Durante el proceso de retransformación, los casetes de transferencia se introducen usando métodos convencionales de bombardeo de partículas (por ejemplo, véase el Ejemplo 5A). Para las plantas de la descendencia que contienen el ADN T integrado de PHP20705 (el sitio diana FRT1-FRT87), se usa el siguiente inserto que comprende el casete de transferencia para la retransformación usando la pistola de partículas:

PHP20915:

35 RB- CaMV35S Term/FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-intrón:luciferasa de Renilla::pinII/ ln2-1 term:Am-Cian1:  
FRT87/CaMV35S Term -LB.  
Los embriones inmaduros de la descendencia que contienen el ADN T integrado de PHP20807 (el sitio diana FRT1-FRT5) se retransforman usando la pistola de partículas con el siguiente plásmido:

40 PHP20954:

RB- CaMV35S Term/FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-intrón: luciferasa de Renilla::pinII/ ln2-1 term:Am-Cian1:  
FRT5/CaMV35S Term -LB.

45 Para los dos plásmidos que comprenden el casete de transferencia (PHP20915 y PHP20954), los genes bar y Cian FP no tienen promotor. Para reducir la probabilidad de que la integración aleatoria no provoque una expresión falsa de cualquier gen, se ha colocado el terminador CaMV35S cadena arriba del sitio FRT1. Cada uno de estos plásmidos se co-transforma en embriones inmaduros para sus líneas diana respectivas junto con el plásmido PHP5096 (Ubi:Ubi-intrón::FLPm::pinII). Cualquiera de PHP20915 o PHP20954 se mezcla con el plásmido que contiene FLP (PHP5096), usando 100 ng del plásmido que contiene FRT y 10 ng del plásmido FLP por bombardeo.

55 Para preparar el ADN para su suministro, se añaden soluciones de ADN a 50 µl de una solución madre de partículas de oro (0,1 µg/µl de partículas de oro de 0,6 micrómetros). Por ejemplo, primero se añaden 10 µl de una solución de 0,1 µg/µl de PHP20915 o PHP20954, y 10 µl de una solución de 0,01 µg/µl de PHP5096 a 30 µl de agua. A esta mezcla de ADN, se añaden 50 µl de la solución madre de oro y la mezcla se sonica brevemente. A continuación se añaden 5 µl de TFX-50 (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711) y la mezcla se pone en un agitador rotatorio a 100 rpm durante 10 minutos. La mezcla se centrifuga brevemente para sedimentar las partículas de oro y retirar el sobrenadante. Después de retirar el exceso de solución de ADN/TFX, se añaden 120 µl de EtOH absoluto, y se dispensan alícuotas de 10 µl sobre los macroportadores típicamente usados con la pistola de partículas de helio Dupont PDS-1000. Las partículas de oro con ADN adherido se dejan secar sobre los portadores y después éstos se usan para bombardeo convencional de partículas. Después de proporcionar la retransformación del plásmido que tiene el casete de transferencia más el plásmido que contiene FLP, los embriones inmaduros se colocan en medio 560P durante dos semanas para la recuperación, y después se mueven a medio que contiene 3 mg/l de bialafos para la selección. La recombinación exitosa en los sitios diana de recombinación tanto 5' (FRT-1) como 3' (FRT87 ó 5) provocará la activación de tanto el gen bar como el gen de la proteína fluorescente cian cuando

estos genes estructurales se pongan en proximidad funcional con los promotores de Ubi o Actina, respectivamente. Por tanto, se seleccionarán acontecimientos de integración específicos de sitio apropiados en base a los fenotipos recién activados. Cuando estos callos son suficientemente grandes para el muestreo, se extrae el ADN genómico del tejido, y se analiza usando PCR para la presencia de productos resultantes de la amplificación de fragmentos usando cebadores que abarcan las uniones promotor-gen recién formadas. Finalmente, se toman muestras foliares de plantas regeneradas para análisis de Southern, para verificar la recombinación apropiada para la transferencia del casete donante en el locus diana genómico. Una vez se han verificado loci recombinante satisfactorios, las plantas se cultivan a madurez y se cruzan o autocruzan.

10 C. Introducción del casete de transferencia por cruce

Los casetes de transferencia pueden proporcionarse por reproducción sexual. En este ejemplo, de nuevo se usan acontecimientos transgénicos estables diana, de una única copia que contienen una única copia de los casetes de ADN T originalmente suministrados de *Agrobacterium* que contiene PHP20705 o PHP20807. Sin embargo, en este método los acontecimientos donantes transgénicos estables se producen usando cualquiera de los dos vectores de *Agrobacterium* de ADN T mostrados a continuación.

1. El vector donante que complementa PHP20705:

20 RB-Axig1::IEC1::pinII/Ubi Pro:Ubi-intrón::YFP::pinII/-LB y  
RB- In2::FLP::pinII-CaMV35S Term/FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-intrón:luciferasa de Renilla::pinII/In2-1 term:Am-Cian1:FRT87/CaMV35S Term -LB

2. El vector donante que complementa PHP20807:

25 RB-Axig1::LEC1::pinII/Ubi Pro:Ubi-intrón::YFP::pinII/-LB y  
RB-In2::FLP::pinII-CaMV35S Term/FRT1:bar::pinII/Ubi:Ubi-intrón:luciferasa de Renilla::pinII/ In2-1 term:Am-Cian1:FRT5/CaMV35S Term -LB

30 Para los dos plásmidos anteriores, los casetes de expresión en el primer ADN T proporcionan un medio para seleccionar las líneas donantes transgénicas después de la transformación mediada por *Agrobacterium*. El segundo ADN T proporciona los componentes para el intercambio de casetes mediado por cruce. Obsérvese que para ambas construcciones, el casete de expresión de FLP inducible está fuera de los sitios FRT y por tanto éste no se transfiere al sitio diana después de intercambio satisfactorio.

35 Los acontecimientos de recombinación que tiene el casete de transferencia se seleccionan por selección visual para callos fluorescentes amarillos de crecimiento vigoroso, regenerados, se cultivan hasta madurez y se cruzan para producir semillas donantes que tengan el casete de transferencia. La semilla de un acontecimiento diana que contiene el fragmento de ADN T de PHP20705 así como la semilla de un acontecimiento donante que contiene el ADN T del plásmido donante n° 1 anterior se plantan y cultivan hasta madurez. Después de florecer, se hacen cruces recíprocos entre las plantas diana y donante. La semilla resultante se planta y se selecciona para los fenotipos recién activados que indiquen una recombinación satisfactoria en los dos sitios FRT diferentes. En este caso, la activación de resistencia a bialafos es indicativa de la recombinación apropiada en FRT5 y la activación de fluorescencia cian es indicativa de la recombinación apropiada en FRT87. Se hacen cruce similares usando líneas diana y de transferencia generadas con PHP20807 y el plásmido donante n° 2, respectivamente.

*Ejemplo 8. Transformación de células bacterianas.*

50 Los nuevos sitios de recombinación proporcionados en este documento también pueden evaluarse y usarse en células bacterianas, tales como *E. coli*. Son bien conocidas muchas líneas celulares competentes disponibles en el mercado y plásmidos bacterianos y están fácilmente disponibles. Los polinucleótidos aislados para transformación y la transformación de células bacterianas pueden hacerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se detallan métodos de *E. coli* y otras transformaciones de células bacterianas, preparación de plásmidos, y el uso de fagos, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., (eds.) (1994) una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.). Por ejemplo, a continuación se resume un protocolo de electroporación eficaz (Tung y Chow, Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 32, otoño 1995).

60 Se inoculan 100 ml de medio LB con 1 ml de cultivo de *E. coli* durante una noche. Se incuban a 37°C con agitación vigorosa hasta que el cultivo alcanza OD600 = 0,6. Se enfría el cultivo en hielo 30 minutos, se sedimentan las células por centrifugación a 4.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se lava el sedimento celular dos veces con 50 ml de glicerol al 10% enfriado en hielo. Después del lavado final, se resuspende el sedimento celular a un volumen final de 0,2 ml en medio GYT enfriado en hielo (glicerol al 10% v/v; extracto de levadura al 0,125% p/v; tritona al 0,25% p/v). Se electroporan en cubetas pre-enfriadas usando las condiciones del fabricante, por ejemplo, 0,5 ng de ADN plasmídico/transformación usando el equipamiento Gene Pulser (BioRad) para 25 µF, 200 ohms, 2,5 kV. Inmediatamente después de la electroporación, se añade 1 ml de medio SOC y se transfieren las células a un tubo

de cultivo. Se incuban a 37°C durante 1 hora. Se siembran alícuotas de células en placas de agar selectivo y se incuban durante una noche a 37°C.

*Ejemplo 9. Transformación de levaduras.*

5 Los nuevos sitios de recombinación proporcionados en este documento también pueden evaluarse y usarse en células de levadura, a partir de las cuales se aislaron inicialmente la recombinasa FLP y los sitios FRT. Están disponibles muchas cepas en el mercado y/o al público de *S. cerevisiae*, así como los plásmidos usados para transformar estas células. Por ejemplo, están disponibles células de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e incluye el inventario del Yeast Genetic Stock Center, que se movió a la ATCC en 1998. También están disponibles otras líneas de levaduras, tales como *S. pombe* y *P. pastoris*, y similares. Por ejemplo, se detallan métodos de transformación de levaduras, preparación de plásmidos, y similares, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., (eds.) (1994) una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., véase la Unidad 13 en particular). Los métodos de transformación para levaduras incluyen transformación de esferoplastos, electroporación, y métodos con acetato de litio. Se describe un método de transformación altamente eficaz, versátil para levaduras por Gietz y Woods ((2002) Methods Enzymol. 350:87-96) usando acetato de litio, PEG 3500 y ADN vehículo.

*Ejemplo 10. Transformación de células de mamífero.*

20 Los nuevos sitios de recombinación proporcionados en este documento también pueden evaluarse y usarse en células de mamífero, tales como CHO, HeLa, BALB/c, fibroblastos, células madre embrionarias de ratón y similares. Son bien conocidas muchas líneas celulares competentes disponibles en el mercado y plásmidos y están fácilmente disponibles, por ejemplo de la ATCC (Manassas, VA). Los polinucleótidos aislados para la transformación y la transformación de las células de mamífero pueden hacerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se detallan métodos de transformación de células de mamífero y otras eucariotas, preparación de plásmidos, y el uso de virus, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. (eds.) (1994) una empresa conjunta entre Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., véase la Unidad 9 en particular). Por ejemplo, están disponibles muchos métodos, tales como transfección con fosfato cálcico, electroporación, transfección con DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, microinyección así como técnicas con virus.

*Ejemplo de referencia 11. Métodos para clonación recombinatoria in vitro.*

35 En los siguientes ejemplos A, B, y C, las dos moléculas de ácido nucleico parentales (por ejemplo, plásmidos) se llaman el "donante de inserto" y el "donante de vector". El donante de inserto contiene un segmento que llegará a unirse a una nueva secuencia aportada por el donante de vector. El acontecimiento de recombinación produce dos moléculas hijas: la primera mencionada como el producto (el nuevo clon deseado) y la segunda mencionada como subproducto.

40 En los siguientes ejemplos, se construyen dos pares de plásmidos para realizar el método de clonación recombinatoria *in vitro* de dos formas diferentes. Se construyen un par de plásmidos, Plásmido A y Plásmido B, con un sitio FRT y un sitio lox, a usar con la recombinasa Cre y FLP. El otro par de plásmidos, Plásmido D y Plásmido E, se construyen para que contengan el sitio FRT (de tipo silvestre) para FLP, y un segundo sitio FRT mutante (SEC ID N° 40), que difiere del sitio FRT de tipo silvestre en 3 de las 30 bases totales. En este ejemplo, cada plásmido comprende una serie de sitios de recombinación funcionales donde los sitios de recombinación son diferentes y no recombinogénicos con respecto unos de otros.

*Tampones:*

50 Pueden usarse diversos tampones conocidos en las reacciones. Para las enzimas de restricción, es aconsejable usar los tampones recomendados por el fabricante. Pueden encontrarse fácilmente tampones alternativos en la bibliografía o pueden deducirlos los especialistas en la técnica. Un tampón ejemplar para la integrasa lambda comprende Tris-HCl 50 mM a pH 7,5-7,8, KCl 70 mM, espermidina 5 mM, EDTA 0,5 mM, y 0,25 mg/ml de albúmina sérica bovina, y opcionalmente, glicerol al 10%. Un tampón ejemplar para la recombinasa P1 Cre comprende Tris-HCl 50 mM, a pH 7,5, NaCl 33 mM, espermidina 5 mM, y 0,5 mg/ml de albúmina sérica bovina, y un tampón ejemplar para FLP se ha analizado anteriormente en el Ejemplo 2. Un tampón ejemplar para las recombinasas Cre y FLP comprende Tris-HCl 50 mM, a pH 7,5, NaCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, y 0,1 mg/ml de BSA (Buchholz et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24:4256-4262). El tampón para otras recombinasas específicas de sitio es conocido en la técnica o pueden determinarlo empíricamente los especialistas en la técnica, particularmente a la luz de los tampones descritos anteriormente.

*A. Clonación recombinatoria usando recombinasa FLP.*

65 Se construyen dos plásmidos. El plásmido donante (plásmido A) comprende en el siguiente orden: un sitio FRT de tipo silvestre, un marcador de fármaco constitutivo (resistencia a cloranfenicol), un origen de replicación, un gen



expresado de forma constitutiva para la proteína represora tet (tetR), un sitio FRT 5, y un marcador de fármaco condicional (resistencia a kanamicina cuya expresión está controlada por el operador/promotor del operón de resistencia a tetraciclina del transposón Tn10). Células *E. coli* que contienen el plásmido A son resistentes a cloranfenicol a 30 µg/ml, pero sensibles a kanamicina a 100 µg/ml.

5 El plásmido donante de inserto (plásmido B) comprende en el siguiente orden: el sitio FRT de tipo silvestre, un marcador de fármaco diferente (resistencia a ampicilina), el sitio FRT 5, un origen, y un sitio de clonación múltiple.

10 Se mezclan aproximadamente 75 ng de cada uno de los plásmidos A y B en un volumen total de 30 µl de tampón de reacción FLP. Se transfieren dos alícuotas de 10 µl a tubos nuevos. Un tubo recibe proteína FLP. Ambos tubos se incuban a 37°C durante 30 minutos, después a 70°C durante 10 minutos. Las alícuotas de cada reacción se diluyen y se transforman en DH5α. Después de la expresión, las alícuotas se siembran en placas en 30 µg/ml de cloranfenicol; 100 µg/ml de ampicilina más 200 µg/ml de meticilina; o 100 µg/ml de kanamicina.

15 Las colonias que son resistentes a cloranfenicol, resistentes a ampicilina y sensibles a kanamicina experimentaron la reacción de recombinación y comprenden el vector de producto recién generado (plásmido C). El plásmido C comprende en el siguiente orden: el sitio FRT de tipo silvestre, el marcador de fármaco constitutivo (resistencia a cloranfenicol), el origen de replicación, el gen expresado de forma constitutiva para la proteína represora tet (tetR), el sitio FRT 5, y el marcador de resistencia a ampicilina.

20 Para confirmar la estructura del vector de producto (plásmido C), las colonias que son resistentes a cloranfenicol, resistentes a ampicilina, y sensibles a kanamicina se pican e inoculan en medio que contiene 100 µg/ml de kanamicina. Se realizan miniprep y los ADN miniprep se cortan con las enzimas de restricción apropiadas y se someten a electroforesis. El plásmido C puede identificarse en base al tamaño predicho para el plásmido de producto y los fragmentos resultantes de la digestión con enzimas de restricción.

#### *B. Clonación recombinatoria usando recombinasa FLP y recombinasa Cre.*

30 Los plásmidos de este método son análogos a los anteriores, excepto que el plásmido D, el plásmido donante de vector, contiene un sitio loxP en lugar del sitio FRT de tipo silvestre, y el plásmido E, el plásmido donante de inserto, contiene el sitio loxP en lugar del sitio FRT de tipo silvestre.

35 Se precipitan en etanol aproximadamente 500 ng de plásmido E y plásmido D y se resuspenden en 40 µl de tampón de reacción Cre/FLP (descrito anteriormente). Las reacciones se incuban a 37°C durante 30 minutos y después a 70°C durante 10 minutos. Se añade tampón TE (90 µl, TE: Tris HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) a cada reacción, y se transforma 1 µl de cada una en *E. coli* DH5α. Las mezclas de reacción se siembran en placas en 100 µg/ml de ampicilina más 200 µg/ml de meticilina; 30 µg/ml de cloranfenicol o 100 µg/ml de kanamicina.

40 Las colonias que son resistentes a cloranfenicol, resistentes a ampicilina y sensibles a kanamicina experimentaron la reacción de recombinación y comprenden el vector de producto recién generado (plásmido F). El plásmido F comprende en el siguiente orden: el sitio loxP de tipo silvestre, el marcador de fármaco constitutivo (resistencia a cloranfenicol), el origen de replicación, el gen expresado de forma constitutiva para la proteína represora tet (tetR), el sitio FRT 5, y el marcador de resistencia a ampicilina.

45 Para confirmar la estructura del vector de producto (plásmido F), las colonias que son resistentes a cloranfenicol, resistentes a ampicilina, y sensibles a kanamicina se pican e inoculan en medio que contiene 900 µg/ml de kanamicina. Se realizan miniprep y los ADN miniprep se cortan con las enzimas de restricción apropiadas y se someten a electroforesis. El plásmido F puede identificarse en base al tamaño predicho para el plásmido de producto y los fragmentos resultantes de la digestión con enzimas de restricción.

50 *C. Clonación recombinatoria in vitro para subclonar el gen de la cloranfenicol acetil transferasa en un vector para la expresión en células eucariotas.*

55 Se construye un plásmido donante de inserto, plásmido G, que comprende en el siguiente orden: un sitio FRT de tipo silvestre, un gen de la cloranfenicol acetil transferasa de *E. coli* que carece de promotor, el sitio FRT 5, un origen de replicación, y un marcador de fármaco constitutivo (resistencia a ampicilina).

60 Se construye un plásmido donante de vector, plásmido H, que comprende en el siguiente orden: gen de resistencia a kanamicina, origen de replicación, el promotor eucariota de citomegalovirus, un sitio FRT de tipo silvestre, el gen expresado de forma constitutiva para la proteína represora tet (tetR), un gen de resistencia a cloranfenicol, y el sitio FRT 5. Se combinan alícuotas de un microlitro de cada plásmido, típicamente aproximadamente 50 ng de ADN miniprep en bruto, en una reacción de 10 µl que contiene un tampón de reacción FLP y recombinasa FLP. Después de incubación a 30°C durante 30 minutos y 75°C durante 10 minutos, se transforma un microlitro en la cepa DH5α competente de *E. coli* (Life Technologies, Inc.). Las alícuotas de las transformaciones se difunden en placas de agar que contienen 200 µg/ml de kanamicina y se incuban a 37°C durante una noche. Una reacción de control por lo

65

demás idéntica contiene solamente el plásmido donante de vector.

Para confirmar la estructura del vector de producto (plásmido I), se realizan miniprep y se cortan los ADN miniprep con las enzimas de restricción apropiadas y se someten a electroforesis. El plásmido I puede identificarse en base al tamaño predicho para el plásmido de producto y los fragmentos resultantes de la digestión con enzimas de restricción para confirmar que la cloranfenicol acetil transferasa está clonada cadena abajo del promotor CMV.

El artículo "un" y "una" se usan en este documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa uno o más de un elemento.

**Lista de secuencias**

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Nuevos sitios de recombinación FRT y métodos de uso

<130> 1525-PCT

<150> 60/700.225

<151> 18-07-2005

<160> 72

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 12

<400> 1

tctatgta 8

<210> 2

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 57

<400> 2

ttttctaa 8

<210> 3

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 85

<400> 3

tttctga 8

<210> 4

<211> 8

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 87

<400> 4  
 tttctgga           8

5    <210> 5  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

10   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 53

      <400> 5  
       tgtaaaaa           8

15   <210> 6  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

20   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 62

25   <400> 6  
       tttaggta           8

      <210> 7  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

30   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 78

35   <400> 7  
       tgaaaaga           8

      <210> 8  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

40   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 34

45   <400> 8  
       tgtaatga           8

      <210> 9  
       <211> 8  
 50   <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

      <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 70

55   <400> 9  
       tatacaaa           8

60   <210> 10  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

65   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 76

<400> 10  
 ttccataa           8

5    <210> 11  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

10   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 89

      <400> 11  
       tctctaga           8

15   <210> 12  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

20   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 43

      <400> 12  
       ttccgaga           8

25   <210> 13  
       <211>8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

30   <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 45

      <400> 13  
       tctcftga           8

35   <210> 14  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213>.Secuencia artificial

      <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 55

45   <400> 14  
       tccacaga           8

      <210> 15  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

      <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 65

55   <400> 15  
       tgattgga           8

      <210> 16  
       <211> 8  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial

      <220>  
       <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 69

ES 2 390 132 T3

<400> 16  
 tttgtga 8

5 <210> 17  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 74

<400> 17  
 tgagagaa 8

15 <210> 18  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Nueva secuencia espaciadora FRT del sitio FRT 86

25 <400> 18  
 tttctcga 8

30 <210> 19  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio de unión de FLP 5' (elemento de simetría) de sitio FRT de tipo silvestre

35 <400> 19  
 agttcctata c 11

40 <210> 20  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio de unión de FLP 3' (elemento de simetría) de sitio FRT de tipo silvestre

45 <400> 20  
 gaataggaac t 11

50 <210> 21  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Nuevo sitio FRT 12 mínimo

55 <400> 21  
 agttcctata ctctatgtag aataggaact 30

60 <210> 22  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Nuevo sitio FRT 57 mínimo

	<400> 22	
	agttcctata cttttctaag aataggaact	30
5	<210> 23 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Nuevo sitio FRT 85 mínimo	
	<400> 23	
	agttcctata ctttctgag aataggaact	30
15	<210> 24 <211>30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Nuevo sitio FRT 87 mínimo	
	<400> 24	
25	agttcctata ctttctggag aataggaact	30
	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Nuevo sitio FRT 53 mínimo	
	<400> 25	
35	agttcctata ctgtaaaaag aataggaact	30
	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Nuevo sitio FRT 62 mínimo	
	<400> 26	
45	agttcctata ctttagtag aataggaact	30
	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Nuevo sitio FRT 78 mínimo	
	<400> 27	
55	agttcctata ctgaaaagag aataggaact	30
	<210> 28 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Nuevo sitio FRT 34 mínimo	
	<400> 28	
65	agttcctata ctttctgag aataggaact	30
	<210> 29 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Nuevo sitio FRT 34 mínimo	

	<400> 28 agttcctata ctgtaatgag aataggaact	30
5	<210> 29 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Nuevo sitio FRT 70 mínimo	
	<400> 29 agttcctata ctatacaaag aataggaact	30
15	<210> 30 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Nuevo sitio FRT 76 mínimo	
25	<400> 30 agttcctata ctccataag aataggaact	30
30	<210> 31 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Nuevo sitio FRT 89 mínimo	
35	<400> 31 agttcctata ctctctagag aataggaact	30
40	<210> 32 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Nuevo sitio FRT 43 mínimo	
45	<400> 32 agttcctata ctccgagag aataggaact	30
50	<210> 33 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Nuevo sitio FRT 45 mínimo	
55	<400> 33 agttcctata ctctcttgag aataggaact	30
60	<210> 34 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Nuevo sitio FRT 55 mínimo	

<400> 34  
 agttcctata ctccacagag aataggaact 30

5 <210> 35  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Nuevo sitio FRT 65 mínimo

<400> 35  
 agttcctata ctgattggag aataggaact 30

15 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Nuevo sitio FRT 69 mínimo

<400> 36  
 agttcctata cttttgtgag aataggaact 30

25 <210> 37  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Nuevo sitio FRT 74 mínimo

<400> 37  
 agttcctata ctgagagaag aataggaact 30

35 <210> 38  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Nuevo sitio FRT 86 mínimo

45 <400> 38  
 agttcctata ctttctcgag aataggaact 30

<210> 39  
 <211> 30  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio FRT de tipo silvestre mínimo

55 <400> 39  
 agttcctata ctttctagag aataggaact 30

60 <210> 40  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 65 <223> Sitio FRT5 mutante mínimo



<400> 40  
 agtcctata ctctttgag aataggaact 30

5 <210> 41  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sitio FRT6 mutante mínimo

<400> 41  
 agtcctata cttttgaag aataggaact 30

15 <210> 42  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sitio FRT7 mutante mínimo

<400> 42  
 agtcctata cttattgaag aataggaact 30

25 <210> 43  
 <211>8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia espaciadora de sitio de recombinación FRT de tipo silvestre

<400> 43  
 35 ttctaga 8

<210> 44  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia espaciadora de sitio de recombinación de FRT5

45 <400> 44  
 cttttgaa 8

<210> 45  
 <211> 1032  
 50 <212> ADN  
 <213> Bacteriófago C1

<220>  
 <221> CDS  
 55 <222> (1)...(1016)

<400> 45

ES 2 390 132 T3

atg tcc aat tta ctg acc gta cac caa aat ttg cct gca tta ccg gtc	48
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val	
1 5 10 15	
gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc agg	96
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg	
20 25 30	
gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc gtt	144
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val	
35 40 45	
tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg ttt	192
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe	
50 55 60	
ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag gcg	240
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala	
65 70 75 80	
cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta aac	288
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn	
85 90 95	
atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat gct	336
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala	
100 105 110	
gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc ggt	384
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly	
115 120 125	
gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag	432
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
130 135 140	

ES 2 390 132 T3

gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat 480  
 Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn  
 145 150 155 160  
  
 ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc gaa 528  
 Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu  
 165 170 175  
  
 att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg aga 576  
 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg  
 180 185 190  
  
 atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca ggt 624  
 Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly  
 195 200 205  
  
 gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga tgg 672  
 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp  
 210 215 220  
  
 att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg aat aac tac ctg ttt tgc 720  
 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys  
 225 230 235 240  
  
 cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag cta 768  
 Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu  
 245 250 255  
  
 tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg att 816  
 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile  
 260 265 270  
  
 tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct gga 864  
 Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly  
 275 280 285  
  
 cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga gtt 912  
 His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val  
 290 295 300  
  
 tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat att 960  
 Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile  
 305 310 315 320  
  
 gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg gtg 1008  
 Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val  
 325 330 335  
  
 cgc ctg ct ggaagatggc gattag 1032  
 Arg Leu

<210> 46  
 <211> 338  
 5 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago C1

<400> 46

Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val

ES 2 390 132 T3

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

<210> 47  
 <211> 1032  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cre del bacteriófago P1 que tiene codones preferidos de  
 10 maíz (moCRE)  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(1032)

<400> 47  
 atg tcc aac ctg ctc acg gtt cac cag aac ctt ccg gct ctt cca gtg 48  
 15 Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val

ES 2 390 132 T3

1	5	10	15	
gac gcg acg tcc gat gaa gtc agg aag aac ctc atg gac atg ttc cgc				96
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg	20	25	30	
gac agg caa gcg ttc agc gag cac acc tgg aag atg ctg ctc tcc gtc				144
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val	35	40	45	
tgc cgc tcc tgg gct gca tgg tgc aag ctg aac aac agg aag tgg ttc				192
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe	50	55	60	
ccc gct gag ccc gag gac gtg agg gat tac ctt ctg tac ctg caa gct				240
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala	65	70	75	80
cgc ggg ctg gca gtg aag acc atc cag caa cac ctt gga caa ctg aac				288
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn	85	90	95	
atg ctt cac agg cgc tcc ggc ctc ccg cgc ccc agc gac tcg aac gcc				336
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala	100	105	110	
gtg agc ctc gtc atg cgc cgc atc agg aag gaa aac gtc gat gcc ggc				384
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly	115	120	125	
gaa agg gca aag cag gcc ctc gcg ttc gag agg acc gat ttc gac cag				432
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	130	135	140	
gtc cgc agc ctg atg gag aac agc gac agg tgc cag gac att agg aac				480
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	145	150	155	160
ctg gcg ttc ctc gga att gca tac aac acg ctc ctc agg atc gcg gaa				528
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	165	170	175	
att gcc cgc att cgc gtg aag gac att agc cgc acc gac ggc ggc agg				576
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	180	185	190	
atg ctt atc cac att ggc agg acc aag acg ctc gtt tcc acc gca ggc				624
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	195	200	205	
gtc gaa aag gcc ctc agc ctc gga gtg acc aag ctc gtc gaa cgc tgg				672
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	210	215	220	
atc tcc gtg tcc ggc gtc gcg gac gac cca aac aac tac ctc ttc tgc				720
Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys	225	230	235	240
cgc gtc cgc aag aac ggg gtg gct gcc cct agc gcc acc agc caa ctc				768
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	245	250	255	

ES 2 390 132 T3

```

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

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

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

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

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

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

```

<210> 48

<211> 1260

5 <212> ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)...(1260)

<400> 48

ES 2 390 132 T3

atg	cca	caa	ttt	ggt	ata	tta	tgt	aaa	aca	cca	cct	aag	gtg	ctt	gtt	48
Met	Pro	Gln	Phe	Gly	Ile	Leu	Cys	Lys	Thr	Pro	Pro	Lys	Val	Leu	Val	
1				5					10					15		
cgt	cag	ttt	gtg	gaa	agg	ttt	gaa	aga	cct	tca	ggt	gag	aaa	ata	gca	96
Arg	Gln	Phe	Val	Glu	Arg	Phe	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ala	
			20					25					30			
tta	tgt	gct	gct	gaa	cta	acc	tat	tta	tgt	tgg	atg	att	aca	cat	aac	144
Leu	Cys	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Cys	Trp	Met	Ile	Thr	His	Asn	
		35					40					45				
gga	aca	gca	atc	aag	aga	gcc	aca	ttc	atg	agc	tat	aat	act	atc	ata	192
Gly	Thr	Ala	Ile	Lys	Arg	Ala	Thr	Phe	Met	Ser	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	
	50					55					60					
agc	aat	tcg	ctg	agt	ttc	gat	att	gtc	aat	aaa	tca	ctc	cag	ttt	aaa	240
Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	Ile	Val	Asn	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Lys	
65					70					75					80	
tac	aag	acg	caa	aaa	gca	aca	att	ctg	gaa	gcc	tca	tta	aag	aaa	ttg	288
Tyr	Lys	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	
				85					90					95		
att	cct	gct	tgg	gaa	ttt	aca	att	att	cct	tac	tat	gga	caa	aaa	cat	336

ES 2 390 132 T3

Ile	Pro	Ala	Trp	Glu	Phe	Thr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gln	Lys	His		
			100					105					110				
caa	tct	gat	atc	act	gat	att	gta	agt	agt	ttg	caa	tta	cag	ttc	gaa	384	
Gln	Ser	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Phe	Glu		
		115					120				125						
tca	tcg	gaa	gaa	gca	gat	aag	gga	aat	agc	cac	agt	aaa	aaa	atg	ctt	432	
Ser	Ser	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	Gly	Asn	Ser	His	Ser	Lys	Lys	Met	Leu		
	130					135					140						
aaa	gca	ctt	cta	agt	gag	ggt	gaa	agc	atc	tgg	gag	atc	act	gag	aaa	480	
Lys	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys		
145					150					155					160		
ata	cta	aat	tcg	ttt	gag	tat	act	tcg	aga	ttt	aca	aaa	aca	aaa	act	528	
Ile	Leu	Asn	Ser	Phe	Glu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr		
				165					170						175		
tta	tac	caa	ttc	ctc	ttc	cta	gct	act	ttc	atc	aat	tgt	gga	aga	ttc	576	
Leu	Tyr	Gln	Phe	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Phe	Ile	Asn	Cys	Gly	Arg	Phe		
			180					185					190				
agc	gat	att	aag	aac	gtt	gat	ccg	aaa	tca	ttt	aaa	tta	gtc	caa	aat	624	
Ser	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Val	Gln	Asn		
		195					200					205					
aag	tat	ctg	gga	gta	ata	atc	cag	tgt	tta	gtg	aca	gag	aca	aag	aca	672	
Lys	Tyr	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr		
	210					215					220						
agc	gtt	agt	agg	cac	ata	tac	ttc	ttt	agc	gca	agg	ggt	agg	atc	gat	720	
Ser	Val	Ser	Arg	His	Ile	Tyr	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Asp		
225					230					235					240		
cca	ctt	gta	tat	ttg	gat	gaa	ttt	ttg	agg	aat	tct	gaa	cca	gtc	cta	768	
Pro	Leu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Asn	Ser	Glu	Pro	Val	Leu		
				245					250					255			
aaa	cga	gta	aat	agg	acc	ggc	aat	tct	tca	agc	aat	aaa	cag	gaa	tac	816	
Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr		
			260				265						270				
caa	tta	tta	aaa	gat	aac	tta	gtc	aga	tcg	tac	aat	aaa	gct	ttg	aag	864	
Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Lys		
			275				280					285					
aaa	aat	gcg	cct	tat	tca	atc	ttt	gct	ata	aaa	aat	ggc	cca	aaa	tct	912	
Lys	Asn	Ala	Pro	Tyr	Ser	Ile	Phe	Ala	Ile	Lys	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser		
	290					295					300						
cac	att	gga	aga	cat	ttg	atg	acc	tca	ttt	ctt	tca	atg	aag	ggc	cta	960	
His	Ile	Gly	Arg	His	Leu	Met	Thr	Ser	Phe	Leu	Ser	Met	Lys	Gly	Leu		
305					310					315					320		
acg	gag	ttg	act	aat	gtt	gtg	gga	aat	tgg	agc	gat	aag	cg	gct	tct	1008	
Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Ser	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser		
				325					330					335			
gcc	gtg	gcc	agg	aca	acg	tat	act	cat	cag	ata	aca	gca	ata	cct	gat	1056	
Ala	Val	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	His	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp		



ES 2 390 132 T3

	340		345		350		
	cac tac ttc gca cta gtt tct cgg tac tat gca tat gat cca ata tca						1104
	His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr Ala Tyr Asp Pro Ile Ser						
	355		360		365		
	aag gaa atg ata gca ttg aag gat gag act aat cca att gag gag tgg						1152
	Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr Asn Pro Ile Glu Glu Trp						
	370		375		380		
	cag cat ata gaa cag cta aag ggt agt gct gaa gga agc ata cga tac						1200
	Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala Glu Gly Ser Ile Arg Tyr						
	385		390		395		400
	ccc gca tgg aat ggg ata ata tca cag gag gta cta gac tac ctt tca						1248
	Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser						
			405		410		415
	tcc tac ata aat						1260
	Ser Tyr Ile Asn						
			420				

<210> 49

<211> 420

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 49

ES 2 390 132 T3

Met	Pro	Gln	Phe	Gly	Ile	Leu	Cys	Lys	Thr	Pro	Pro	Lys	Val	Leu	Val
1				5					10					15	
Arg	Gln	Phe	Val	Glu	Arg	Phe	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ala
			20					25					30		
Leu	Cys	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Cys	Trp	Met	Ile	Thr	His	Asn
		35					40					45			
Gly	Thr	Ala	Ile	Lys	Arg	Ala	Thr	Phe	Met	Ser	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile
	50					55					60				
Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	Ile	Val	Asn	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Lys
65					70					75					80
Tyr	Lys	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu
				85					90					95	
Ile	Pro	Ala	Trp	Glu	Phe	Thr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gln	Lys	His
			100					105					110		
Gln	Ser	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Phe	Glu
		115					120					125			
Ser	Ser	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	Gly	Asn	Ser	His	Ser	Lys	Lys	Met	Leu
	130					135					140				
Lys	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys
145					150					155					160
Ile	Leu	Asn	Ser	Phe	Glu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr
				165					170					175	
Leu	Tyr	Gln	Phe	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Phe	Ile	Asn	Cys	Gly	Arg	Phe
			180					185					190		
Ser	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Val	Gln	Asn
	195						200					205			
Lys	Tyr	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr
	210					215						220			
Ser	Val	Ser	Arg	His	Ile	Tyr	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Asp
225					230					235					240
Pro	Leu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Asn	Ser	Glu	Pro	Val	Leu
				245					250					255	
Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr
			260					265					270		
Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Lys
		275					280					285			
Lys	Asn	Ala	Pro	Tyr	Ser	Ile	Phe	Ala	Ile	Lys	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser
	290					295					300				
His	Ile	Gly	Arg	His	Leu	Met	Thr	Ser	Phe	Leu	Ser	Met	Lys	Gly	Leu
305					310					315					320
Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Ser	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser
				325					330					335	
Ala	Val	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	His	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp
			340					345					350		
His	Tyr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile	Ser
		355					360					365			
Lys	Glu	Met	Ile	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Thr	Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Trp
	370					375					380				
Gln	His	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr
385					390					395					400
Pro	Ala	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser	Gln	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Ser
				405					410					415	
Ser	Tyr	Ile	Asn												
			420												

<210> 50  
 <211> 1260

ES 2 390 132 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de nucleótidos que tiene codones preferidos de maíz que codifica la FLP recombinante (FLPm)

<221>CDS

<222> (1)...(1260)

<400> 50

```

atg ccc cag ttc gac atc ctc tgc aag acc ccc ccc aag gtg ctc gtg 48
Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val
 1                               5                               10                               15

agg cag ttc gtg gag agg ttc gag agg ccc tcc ggc gag aag atc gcc 96
Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ala
                20                               25                               30

ctc tgc gcc gcc gag ctc acc tac ctc tgc tgg atg atc acc cac aac 144
Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys Trp Met Ile Thr His Asn
                35                               40                               45

ggc acc gcc att aag agg gcc acc ttc atg tca tac aac acc atc atc 192
Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile
                50                               55                               60

tcc aac tcc ctc tcc ttc gac atc gtg aac aag tcc ctc cag ttc aaa 240
Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys
 65                               70                               75                               80

tac aag acc cag aag gcc acc atc ctc gag gcc tcc ctc aag aag ctc 288
Tyr Lys Thr Gln Lys Ala Thr Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Lys Leu
                85                               90                               95
    
```

10

ES 2 390 132 T3

atc ccc gcc tgg gag ttc acc atc atc ccc tac tac ggc cag aag cac 336  
 Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His  
 100 105 110

cag tcc gac atc acc gac atc gtg tca tcc ctc cag ctt cag ttc gag 384  
 Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln Phe Glu  
 115 120 125

tcc tcc gag gag gct gac aag ggc aac tcc cac tcc aag aag atg ctg 432  
 Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser His Ser Lys Lys Met Leu  
 130 135 140

aag gcc ctc ctc tcc gag ggc gag tcc atc tgg gag atc acc gag aag 480  
 Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile Trp Glu Ile Thr Glu Lys  
 145 150 155 160

atc ctc aac tcc ttc gag tac acc tcc agg ttc act aag acc aag acc 528  
 Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg Phe Thr Lys Thr Lys Thr  
 165 170 175

ctc tac cag ttc ctc ttc ctc gcc acc ttc atc aac tgc ggc agg ttc 576  
 Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe Ile Asn Cys Gly Arg Phe  
 180 185 190

tca gac atc aag aac gtg gac ccc aag tcc ttc aag ctc gtg cag aac 624  
 Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser Phe Lys Leu Val Gln Asn  
 195 200 205

aag tac ctc ggc gtg atc atc cag tgc ctc gtg acc gag acc aag acc 672  
 Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu Val Thr Glu Thr Lys Thr  
 210 215 220

tcc gtg tcc agg cac atc tac ttc ttc tcc gct cgc ggc agg atc gac 720  
 Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser Ala Arg Gly Arg Ile Asp  
 225 230 235 240

ccc ctc gtg tac ctc gac gag ttc ctc agg aac tca gag ccc gtg ctc 768  
 Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg Asn Ser Glu Pro Val Leu  
 245 250 255

aag agg gtg aac agg acc ggc aac tcc tcc tcc aac aag cag gag tac 816  
 Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser Ser Asn Lys Gln Glu Tyr  
 260 265 270

cag ctc ctc aag gac aac ctc gtg agg tcc tac aac aag gcc ctc aag 864  
 Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser Tyr Asn Lys Ala Leu Lys  
 275 280 285

aag aac gcc ccc tac tcc atc ttc gcc atc aag aac ggc ccc aag tcc 912  
 Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile Lys Asn Gly Pro Lys Ser  
 290 295 300

cac atc ggt agg cac ctc atg acc tcc ttc ctc tca atg aag ggc ctc 960  
 His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe Leu Ser Met Lys Gly Leu  
 305 310 315 320

acc gag ctc acc aac gtg gtg ggc aac tgg tcc gac aag agg gcc tcc 1008  
 Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp Ser Asp Lys Arg Ala Ser  
 325 330 335

gcc gtg gcc agg acc acc tac acc cac cag atc acc gcc atc ccc gac 1056

ES 2 390 132 T3

Ala	Val	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	His	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp	
			340					345					350			
cac	tac	ttc	gcc	ctc	gtg	tca	agg	tac	tac	gcc	tac	gac	ccc	atc	tcc	1104
His	Tyr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile	Ser	
		355					360					365				
aag	gag	atg	atc	gcc	ctc	aag	gac	gag	act	aac	ccc	atc	gag	gag	tgg	1152
Lys	Glu	Met	Ile	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Thr	Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Trp	
	370					375					380					
cag	cac	atc	gag	cag	ctc	aag	ggc	tcc	gcc	gag	ggc	tcc	atc	agg	tac	1200
Gln	His	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr	
385				390						395					400	
ccc	gcc	tgg	aac	ggc	atc	atc	tcc	cag	gag	gtg	ctc	gac	tac	ctc	tcc	1248
Pro	Ala	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser	Gln	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Ser	
			405					410						415		
tcc	tac	atc	aac													1260
Ser	Tyr	Ile	Asn													
			420													

<210> 51

<211>78

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

10 <221> misc\_feature

<222> 38, 39,40, 41, 42, 43

<223> n = A, T, C o G

<400> 51

15

gccagcatgc aagcttgaat tccgaagttc ctatactnnn nnnagaatag gaacttcgag 60  
atctggatcc gcggaacg 78

<210> 52

<211> 78

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

25 <221> misc\_feature

<222> 36, 37, 38, 39, 40, 41

<223> n = A, T, C o G

<400> 52

30

cgttccgagg atccagatct cgaagttcct attctnnnnn nagtatagga acttcggaat 60  
tcaagcttgc atgctggc 78

<210> 53

<211> 23

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 53  
 gcacatacaa atggacgaac gga 23

5 <210> 54  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 54  
 cctcttcgct attacgccag ct 22

15 <210> 55  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia espaciadora del sitio FRT6

<400> 55  
 ttttgaa 8

25 <210> 56  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia espaciadora del sitio FRT7

<400> 56  
 ttattgaa 8

35 <210> 57  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia espaciadora del sitio FRT22 documento WO 01/23545

45 <400> 57  
 tatctaga 8

<210> 58  
 <211> 8

50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia espaciadora del sitio FRT72 documento WO 01/23545

55 <400> 58  
 tttctaca 8

<210> 59  
 <211> 8

60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 65 <223> Secuencia espaciadora del sitio FRT3 documento WO 01/23545

# ES 2 390 132 T3

<400> 59  
tatttgaa 8

5 <210> 60  
<211> 8  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia espaciadora del sitio FRT2161 documento WO 01/23545

<400> 60  
tctctgga 8

15 <210> 61  
<211> 8  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia espaciadora del sitio FRT2151 documento WO 01/23545

<400> 61  
tctccaga 8

25 <210> 62  
<211> 8  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia espaciadora del sitio FRT2272 documento WO 01/23545

<400> 62  
tatctaca 8

35 <210> 63  
<211> 8  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia espaciadora del sitio FRT2262 documento WO 01/23545

45 <400> 63  
tatcttga 8

<210> 64  
<211> 8

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia espaciadora del sitio FRT2373 documento WO 01/23545

55 <400> 64  
tgtctata 8

<210> 65  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>

65 <223> Sitio FRT f22 mínimo documento WO 01/23545

<400> 65  
 agttcctata ctatctagag aataggaact 30

5 <210> 66  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sitio FRT f72 mínimo documento WO 01/23545

<400> 66  
 agttcctata cttctacag aataggaact 30

15 <210> 67  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sitio FRT f3 mínimo documento WO 01/23545

<400> 67  
 agttcctata ctatttgaag aataggaact 30

25 <210> 68  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sitio FRT f2161 mínimo documento WO 01/23545

<400> 68  
 agttcctata ctctctggag aataggaact 30

35 <210> 69  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sitio FRT f2151 mínimo documento WO 01/23545

45 <400> 69  
 agttcctata ctctccagag aataggaact 30

<210> 70  
 <211> 30

50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio FRT f2272 mínimo documento WO 01/23545

55 <400> 70  
 agttcctata ctatctacag aataggaact 30

<210> 71  
 <211> 30

60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio FRT f2262 mínimo documento WO 01/23545

65



<400> 71  
agttcctata ctatcttgag aataggaact 30

5 <210> 72  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sitio FRT f2373 mínimo documento WO 01/23545

<400> 72  
agttcctata ctgtctatag aataggaact 30

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un primer sitio de recombinación FRT que comprende la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de recombinación FRT que comprende la SEC ID N° 39.
2. Una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1.
- 10 3. La célula de la reivindicación 2, en la que la célula es de una planta.
4. Una planta que comprende la célula de la reivindicación 3.
- 15 5. La célula de la reivindicación 3, en la que la célula vegetal es de una planta seleccionada entre maíz, arroz, trigo, cebada, mijo, sorgo, centeno, soja, alfalfa, colza, Arabidopsis, tabaco, girasol, algodón, y cártamo.
6. Un método para dirigir la inserción de un polinucleótido de interés a un sitio diana, comprendiendo dicho método:
- 20 (a) proporcionar una célula que tiene integrado de forma estable en su genoma el sitio diana que comprende un primer sitio de recombinación que comprende la SEC ID N° 21 y un segundo sitio de recombinación que comprende la SEC ID N° 39;
- (b) proporcionar un casete de transferencia que comprende el polinucleótido de interés, en el que dicho polinucleótido de interés está flanqueado por dicho primer y dicho segundo sitios de recombinación; y
- (c) proporcionar una recombinasa FLP, en el que dicha recombinasa reconoce y lleva a cabo la recombinación en el primer y el segundo sitios de recombinación, y el polinucleótido de interés se inserta en el sitio diana.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que la célula es de una planta seleccionada entre maíz, arroz, trigo, cebada, mijo, sorgo, centeno, soja, alfalfa, colza, Arabidopsis, tabaco, girasol, algodón, y cártamo.
- 30 8. El método de la reivindicación 6 ó 7, en el que proporcionar el casete de transferencia o la recombinasa FLP comprende transformación.