



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

(21) BR 102013032200-8 A2

(22) Data do Depósito: 13/12/2013

(43) Data da Publicação: 24/11/2015

(RPI 2342)



* B R 1 0 2 0 1 3 0 3 2 2 0 0 A

(54) Título: DIRECIONAMENTO PRECISO DE UM GENE PARA UM LOCUS ESPECÍFICO EM MILHO

(51) Int. Cl.: C12N 15/66; C12N 15/82; A01H 1/00; A01H 5/00

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2012 US 61/736,856, 07/05/2013 US 61/820,231

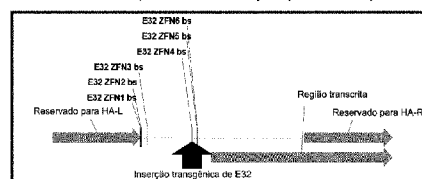
(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC

(72) Inventor(es): W. MICHAEL AINLEY, JAMES W. BING, DAVID H. CORBIN, STEVEN L. EVANS, JOSEPH F. PETOLINO, LAKSHMI SASTRY-DENT, STEVEN A. THOMPSON, STEVEN R. WEBB, MARY E. WELTER, NING ZHOU

(74) Procurador(es): DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA - API 192

(57) Resumo: DIRECIONAMENTO PRECISO DE UM GENE PARA UM LOCUS ESPECÍFICO EM MILHO. A presente invenção reivindica os métodos para a integração estável de DNA exógeno em uma localização específica, E32, no genoma de milho através do uso de nucleases de dedo de zinco. Plantas e partes de planta de milho que foram transformadas pelos métodos da invenção são reivindicadas. A invenção é útil para a criação de características desejáveis tais como, resistência a herbicida, tolerância a herbicida, resistência a inseto, tolerância a inseto, resistência à doença, tolerância à doença, tolerância à tensão, e resistência à tensão no milho. A localização E32 representa um sítio superior para a inserção de genes estranhos porque os fenótipos agrônômicos nativos não são perturbados.

Descreve a relação dos ZFNs designados a ligar o loco genômico da inserção no evento de milho DAS-59132. Seis ZFNs (E32 ZFN 1-6) foram identificados a partir do ensaio de levedura e quatro ZFNs foram avançados para análise em plantas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DIRECIONAMENTO PRECISO DE UM GENE PARA UM LOCUS ESPECÍFICO EM MILHO"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisória dos Estados Unidos 61/736856, depositado em 13 de Dezembro de 2012 e para o Pedido de Patente Provisória dos Estados Unidos 61/820231 depositado em 7 de Maio de 2013. Os conteúdos da totalidade de cada um dos antecedentes são, pelo presente, incorporados em suas totalidades por esta referência.

CAMPO TÉCNICO

[002] Esta descrição refere-se à integração estável alvejada de polinucleotídeos estrangeiros em um loco particular do genoma de milho através do uso de nucleases de dedo de zinco.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA SUBMETIDA ELETRONICAMENTE

[003] A cópia oficial da listagem de sequência é submetida eletronicamente por meio da EFS-Web como uma listagem de sequência formada por ASCII com um arquivo chamado "74381_ST25.txt", criado em 26 de novembro de 2013, e tendo um tamanho de 23,7 *kilobytes* e é depositada concomitantemente com o relatório descritivo. A listagem de sequência contida neste documento formado por ASCII é parte do relatório descritivo e é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTE

[004] O loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 é descrito na Patente dos Estados Unidos 8.273.535, MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE EVENTO DE MILHO DAS-59132. O cassete de expressão integrado no cromossomo 8 do genoma de milho B73 deu origem à região de germoplasma de milho Hi-II (D. D. Songstad, W. L. Petersen, C. L. Armstrong, *American Journal of Botany*, volume 79, pp. 761-

764, 1992) como uma inserção de filamento T de tamanho natural. Além disso, o DNA genômico circundante ao loco transgênico carecia de quaisquer grandes deleções em relação à sequência de B73 nativa, e era geralmente destituído de elementos repetitivos com exceção de um pequeno elemento repetitivo, único. Estudos extensivos de campo revelaram que a presença do evento não, adversamente, afeta o crescimento e desenvolvimento normal de plantas que realizaram o evento. Além disso, as linhagens de milho transportando o evento mantiveram as características de reprodução e agronômicas compatíveis no desempenho agrônômico com isolinhas não transformadas. Em consequência, o loco genômico em que o evento de Milho DAS-59132 integrado representa um loco genômico endógeno excelente em milho para a integração alvejada de outros constructos transgênicos e aqui a seguir é referido como o local E32 ou Evento 32.

[005] A modificação de genoma alvejado de plantas tem sido uma meta evasiva e de longa data tanto de pesquisa aplicada quanto de pesquisa básica. Os métodos e composições para alvejar e clivar o DNA genômico por nucleases específicas do sítio estão sendo desenvolvidos para alcançar esta meta. As nucleases específicas do sítio incluem, porém não são limitadas a (Nucleases de dedo de zinco (ZFNs), Meganucleases, TALENS e CRISPR/Cas com um RNA crRNA/tracr construído, veja Burgess; e outro; *Nature Reviews Genetics* 14, 80-81 (Fevereiro de 2013)). A clivagem específica do sítio de locos genômicos por ZFNs pode ser usada, por exemplo, para induzir à metagênese alvejada, induzir à deleções alvegadas de sequências de DNA celular, e facilitar a recombinação alvejada de um doador exógeno polinucleotídeo de DNA dentro de um loco genômico predeterminado. Veja, por exemplo, Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; e 20060188987, e Pedido de Patente Internacional nº WO 2007/014275, as descrições dos quais

são incorporadas por referência em suas totalidades para todos os propósitos. O Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20080182332 descreve o uso de nucleases de dedo de zinco não canônicas (ZFNs) para modificação alvejada de genomas de planta e o Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20090205083 descreve a modificação alvejada mediada por ZFN de um loco genômico de EPSPs de planta. Além disso, Moehle, e outro, (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos da América 104(9): 3055-3060 descrevem o uso de ZFNs projetadas para adição de gene alvejado em um loco de genômico específico. Os métodos atuais de alvejamento tipicamente envolvem a co-transformação de tecido de planta com um polipeptídeo de polinucleotídeo de DNA doador contendo pelo menos um transgene e um sítio nuclease específico que é projetado para se ligar a e clivar um loco genômico específico. Isto faz o polinucleotídeo de DNA doador, eventualmente, inserir-se dentro do loco genômico clivado resultando na adição de gene alvejado em um loco genômico específico.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A invenção atualmente reivindicada é um método de integrar uma ou mais sequências de ácido nucléico exógenas no genoma de uma célula de milho tendo um loco E32. O método compreende fazer uma clivagem de filamento duplo no loco E32 usando uma ou mais nucleases de dedo de zinco compreendendo um domínio de ligação de dedo de zinco que se liga a um sítio alvo selecionado do grupo mostrado na tabela 1B. Estes resultados na integração de um polinucleotídeo funcional compreendendo uma ou mais sequências exógenas no genoma da célula de milho dentro do loco E32. O método opcionalmente inclui expressar um produto de gene codificado e controlado por uma ou mais sequências exógenas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[007] A Figura 1 representa a relação das ZFNs projetadas para

se ligarem ao loco E32. Seis ZFNs (ZFN1-6 de E32) foram identificadas a partir do ensaio de levedura e quatro ZFNs foram avançadas para avaliação em plantas.

[008] A Figura 2 é um mapa de plasmídeo de pDAB105906.

[009] A Figura 3 é um mapa de plasmídeo de pDAB111809.

[010] A Figura 4 é um mapa de plasmídeo de pDAB100655 e representa um constructo de doador típica em que outras sequências de codificação desejáveis, incluindo porém não limitadas a PAT, podem ser substituídas pela região de AAD-1.

[011] A figura 5 é um gráfico da ruptura do loco de ZFN do loco E32 com flechas que indicam um loco genômico rompido.

[012] A Figura 6 é um mapa de plasmídeo para pDAB108688 (vetor de controle).

[013] A Figura 7 é um mapa de plasmídeo para pDAB108690 (vetor de alvejamento).

[014] A Figura 8 mostra o loco de iniciador e sonda para a qPCR de ruptura de ZFN.

[015] A Figura 9 é um gráfico de ensaio de ruptura de ZFN (os parênteses superiores indicam os eventos não rompidos e os parênteses inferiores mostram eventos rompidos).

[016] A Figura 10 é um mapa de plasmídeo de pDAB104179.

[017] A Figura 11 mostra o loco de iniciador e sonda para a qPCR de ruptura de ZFN.

[018] A Figura 12 é um gráfico de ensaio de ruptura de ZFN (parênteses superiores indicam os eventos não rompidos negativos e os parênteses inferiores mostram os eventos rompidos).

[019] A Figura 13 mostra a localização do iniciador para PCR *in/out*.

[020] A Figura 14 é uma estratégia de análise de *Southern* que mostra a localização de sítios de corte de enzima e iniciadores para

geração de sítios.

[021] A Figura 15 é um mapa de plasmídeo de pDAB107855.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[022] A molécula de DNA de tamanho natural (PHI17662A) usada para transformar o Evento de Milho DAS-59132, o final 3' da sequência de flanqueamento genômica, a junção de genoma de milho PHI17662A / 3' são descritos na descrição de Patente dos Estados Unidos 8.273.535. O loco E32 é descrito por SEQ ID NO:1 e se relaciona às regiões de flanqueamento genômico de Evento de Milho DAS-59132 que foram usadas para identificar sequências alvos genômicas para planejar domínios de ligação de proteína de dedo de zinco para inserção de gene de expressão. Estes sítios alvos incluem, porém não são limitados àqueles descritos na Tabela 1B. Após ter identificado o loco E32 como uma localização altamente desejável para inserção de genes exógenos, o que é uma modalidade desta invenção, está bem dentro do alcance dos técnicos versados para identificar e usar outros sítios alvos dentro do loco E32.

[023] SEQ ID NO:1 é fornecida como a seguinte sequência:

```

agtgggaaggcaaacgaatataagtgcaftcggactactgtttagtcgagtcataatgaaggaatfcattgtaaatgttctaacctaacctaagtatt
aggcagctatggctgatggactctgattgactgtatccatgataagttfaagagcaactcaaaagaggttaggtatataatgtttgtaaaaggt
aaatttagttaataatagaaaaaaaagtgtatccaataggtctataaacaactctcaaatitagtggtcttctatccatccacttctctctatffff
ggatagcctgatttactctctattcagfccgtaggttaatgagctgtggtgattagcctacacttttctgtaaaatctatfftagatagtagctaaatcag
taaatfaggctagtagtttttagctattctctggagtttgctataagaccagaacatgtaaatfaggagttgtggaccggcagagaatgcatgacaa
atccagagattgatgatgaatfcacctatfaccgactcttccattgtgctcatttctcatcatccccgggcgcttctgcatccggtacagctga
catgacacggtcaccggtfacatggctgatggctcacaagtcacccccacatgtctagtgttgcgccagggcagatcgtcctcggcctcgcgctgcc
gtctcttggccgcttcttggccctgctggcggccgctgcccacacggcctacgggtgcaggcagcggccaccgaaccgcagtc
ttgtgtcccagatggcagtgccagtgccactggcacggcagcggatcgtcctccgctcatctgctgacagtgatagagcagcgttgg
ccgttggggccggatctccgtgaagcggctgctccctgctgactgtgccgctatggcgtgctgcttcccatgtttctttttttttttttttttttttt
tgctagggcggttctcgtcgtggttaacagggaccacttcggtgatccgttgaatttactgaaagagatgggaatggcgtgctgctcccgggac
attgaatgagatggtgtaagtgaatatggcttagcctttgcgagtgggggcggcaatgcacggcatgaactataatfcccggfcaaaccttttgtg
ggaatggatgctaacgaacacaaaccgggttaaacagagggccgacacggcgcacacggcgacattcaccggccggcttctcctcgcgcc

```

actggcacaaggctcatcagtcgccgatgccgatgcgatcaacgggaagcggatggcccgtctttagaattggcacaaggaaactggcca
ctgcccttgatgtgcaattatgcctgcgaaagcctaggcacaacacgcgcaataaacgagcgaatgacacggaaagctgatgtggtatgaattat
acaacattatgggcaaaaatattctatccaccattgtgtagccacagcaltcggatattgagttgtcggaggacaatccctcgtgagggtcaaaa
acagcaataataaacctctcctgaagacacaaaaaaaggagcagctcctcgtgcaatgaacaagcgtcacaagaaaaggagcagc
taataaacctcttcaattgcttcagcatgaaaagaacgggaagaaatgcaagtctacagaggaaagtcagctgttccggctgccatggcaagt
cctacatgggcgaggaaaagctgaactggattccagctctcgcgctgcatgctcagcttctttaggatggcaatagttcacctggatgaaaa
agatacaagtttagcttgaagcagtcgagtgacatccaaagtataaaaatcgaagcttgaatggggaaggaaatatacctctaccggaaa
agtttgtaggcaaaaataatccaacgccagcagactccggaacgttgcgaaattcagaagccgaaaagttctgtactcacctccgaca
gttccgaaagttccagcagtaaggatcgtggccatggattccagcgtctctgaatatctgagggcagatcaaaagaaagtcagcga
ggcagacacggccagatcacctcccaagtaatccctccagggtcagccgagccactctccagttattaaggacatgcctccgcgcctctgt
gggccaactccccttaatctgaaaccagcagagatgacggctccgccaagctgcacactggagaagaatfacctccaagataaaacctctctg
gcactgatgaagtcgaattcatgaatccccctgcaagcggtaaaatgacaccgctcctacaccaacgttgagagcagcactataaaatcccaa
aggcacagcaccacgtacatcgaactcctgagagcaaaccaacggcaatattttgtaatgtgatggcagaactgagaagatcagataaaat
tataactgatcaattattcatagttcggccatgaactgtaagggttagacaaaagcaaaaagtaagacatgaagggaagagaataacctgc
cggaaatatcctaatcctttgctattccatagaccaccaactgagaaagttgactgaaacgcatactcttcgttggcctaagatggaatccctctat
caatctgtatgtgactcaatgcagaaaaggttatgccctaactgcctccttatggcctttgatgagacacgtgatggatgtaaggtacgc
cacgcaaggttgatgacaagtcattggtcctgttgacagcaaaccaaatgaaaggccaagtaggcgctcctgtgatgaaaactcagccaa
tcttgatgacaaaagatgccgagccatcaatggtgttgattgattaaacctcggtaggcagactccaacaccaactctgttgttggtccca
acaaaaggatcctgatgcatcccagatgcatcaccatagccaaacaagttctcaacttaagtgaccttccagcgaccaagatctgectacaagag
tggcaagcagctca

[024] A presente descrição também se refere aos métodos e composições para integração alvejada no loco E32 de milho usando ZFNs e um constructo de doador de gene. A prática dos métodos, bem como a preparação e o uso das composições descritas aqui, empregam, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais em biologia molecular, bioquímica, estrutura e análise de cromatina, química computacional, cultura celular, DNA recombinante e campos relacionados quando se incluem na experiência da técnica. Estas técnicas são totalmente explicadas na literatura. Veja, por exemplo, Sambrook, e outro, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 e Terceira edição, 2001; Ausubel, e outro, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1987 e atualizações periódicas; as séries METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic

Press, San Diego; Wolfe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, terceira edição, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, volume 304, "Chromatin" (P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, edições), Academic Press, San Diego, 1999; e METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, volume 119, "Chromatin Protocols" (P. B. Becker, edição) Humana Press, Totowa, 1999.

[025] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados intercambiavelmente para referir-se a um polímero de resíduos de aminoácido. O termo também se aplica aos polímeros de aminoácido em que um ou mais aminoácidos são análogos químicos ou derivados modificados de aminoácidos de ocorrência natural correspondentes.

[026] "Ligação" refere-se a uma interação não covalente, específica da sequência entre as macromoléculas (por exemplo, entre uma proteína e um ácido nucleico). Nem todos os componentes de uma interação de ligação precisam ser específicos da sequência (por exemplo, contatos com resíduos de fosfato em um esqueleto de DNA), contanto que a interação como um todo seja específica da sequência. Tais interações são geralmente caracterizadas por uma constante de dissociação (K_d) de 10^{-6} M ou menor. "Afinidade" refere-se à força de ligação: afinidade de ligação aumentada sendo correlacionada com uma constante de ligação menor (K_d).

[027] Uma "proteína de ligação" é uma proteína que é capaz de se ligar não covalentemente a outra molécula. Uma proteína de ligação pode se ligar a, por exemplo, uma molécula de DNA (uma proteína de ligação de DNA), uma molécula de RNA (uma proteína de ligação de RNA) e/ou uma molécula de proteína (uma proteína de ligação de proteína). No caso de uma proteína de ligação de proteína, ela pode se ligar a si mesma (para formar homodímeros, homotrímeros, etc.) e/ou pode se ligar a um ou mais moléculas de uma proteína ou proteínas diferentes. Uma proteína de ligação pode ter mais do que um tipo de

atividade de ligação. Por exemplo, as proteínas de dedo de zinco têm atividade de ligação de proteína, ligação de RNA e ligação de DNA.

[028] Uma "proteína de ligação de DNA de dedo de zinco" (ou domínio de ligação) é uma proteína, ou um domínio dentro de uma proteína maior, que se liga ao DNA em uma maneira específica da sequência através de um ou mais dedos de zinco, que são regiões de sequência de aminoácido dentro do domínio de ligação cuja estrutura é estabilizada através da coordenação de um íon de zinco. O termo proteína de ligação de DNA de dedo de zinco é frequentemente abreviado como proteína de dedo de zinco ou ZFP.

[029] Os domínios de ligação de dedo de zinco podem ser "planejados" para se ligarem a uma sequência de nucleotídeo predeterminada. Os exemplos não limitantes de métodos para planejar proteínas de dedo de zinco são planejamento e seleção. Uma proteína de dedo de zinco projetada é uma proteína que não ocorre na natureza cujo planejamento/composição resulta de critérios racionais. O critério racional para planejamentos inclui aplicação de regras de substituição e algoritmos computadorizados para processamento de informação em um banco de dados que armazena informação de planejamentos de ZFP existentes e dados de ligação. Veja, por exemplo, patentes dos Estados Unidos n^{os} 6.140.081; 6.453.242; 6.534.261 e 6.794.136; veja também WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 e WO 03/016496.

[030] "Clivagem" refere-se à ruptura do esqueleto covalente de uma molécula de DNA. A clivagem pode ser iniciada por uma variedade de métodos que incluem, porém não são limitados a, hidrólise química ou enzimática de uma ligação de fosfodiéster. Tanto a clivagem de filamento único quanto a clivagem de filamento duplo são possíveis, e a clivagem de filamento duplo pode ocorrer como resultado de dois eventos de clivagem de filamento único distintos. A clivagem de DNA

pode resultar na produção de extremidades cegas ou extremidades escalonadas. Em certas modalidades, os polipeptídeos de fusão são usados para clivagem de DNA de filamento duplo alvejado. Um "domínio de clivagem" compreende uma ou mais sequências de polipeptídeo que possuem atividade catalítica para clivagem de DNA. Um domínio de clivagem pode estar contido em uma cadeia de polipeptídeo única ou a atividade de clivagem pode resultar da associação de dois (ou mais) polipeptídeos.

[031] Um "sítio alvo" ou "sequência alvo" é uma sequência de ácido nucleico que define uma porção de um ácido nucleico à qual uma molécula de ligação se ligará, com a condição de que as condições suficientes para a ligação existam.

[032] Uma molécula "exógena" é uma molécula que não está normalmente presente em uma célula, porém pode ser introduzida em um ou mais métodos genéticos, bioquímicos ou outros. "Presença normal na célula" é determinada com relação ao estágio de desenvolvimento particular e condições ambientais da célula. Desse modo, por exemplo, uma molécula induzidas por choque térmico é uma molécula exógena em relação a uma célula não chocada por calor. Uma molécula exógena pode compreender, por exemplo, uma sequência de codificação para qualquer polipeptídeo ou fragmento do mesmo, uma versão de funcionamento de uma molécula endógena com mau funcionamento ou uma versal de mau funcionamento de uma molécula endógena de funcionamento normal. Além disso, uma molécula exógena pode compreender uma sequência de codificação de outras espécies.

[033] Os ácidos nucleicos incluem DNA e RNA, podem ser de filamento único ou duplo; podem ser lineares, ramificados ou circulares; e podem ser de qualquer comprimento. Os ácidos nucleicos incluem aqueles capazes de formar duplexes, bem como ácidos nucleicos de formação de triplex. Veja, por exemplo, as patentes dos Estados

Unidos n^{os} 5.176.996 e 5.422.251. As proteínas incluem, porém não são limitadas a, proteínas de ligação de DNA, fatores de transcrição, fatores de remodelação de cromatina, proteínas de ligação de DNA metilado, polimerases, metilases, desmetilases, acetilases, desacetilases, cinases, fosfatases, integrases, recombinases, ligases, topoisomerasas, ginases e helicases.

[034] Um "produto de um ácido nucleico exógeno" inclui tanto produtos de polinucleotídeo e polipeptídeo, por exemplo, produtos de transcrição (polinucleotídeos tal como RNA) e produtos de translação (polipeptídeos) e os produtos de expressão de gene e produtos de gene.

[035] Uma molécula de "fusão" é uma molécula em que duas ou mais moléculas de subunidade são ligadas, por exemplo, covalentemente. As moléculas de subunidade podem ser o mesmo tipo químico de molécula, ou pode ser tipos químicos diferentes de moléculas. Os exemplos do primeiro tipo de molécula de fusão incluem, porém não são limitados a, proteínas de fusão (por exemplo, uma fusão entre um domínio de ligação de DNA de ZEP e um domínio de clivagem) e ácidos nucleicos de fusão (por exemplo, um ácido nucleico que codifica a proteína de fusão descrita supra). Os exemplos do segundo tipo de molécula de fusão incluem, porém não são limitados a, uma fusão entre um ácido nucleico de formação de triplex e um polipeptídeo, e uma fusão entre um aglutinante de sulco menor e um ácido nucleico.

[036] A expressão de uma proteína de fusão em uma célula pode resultar da liberação da proteína de fusão para a célula ou por liberação de um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão de uma célula, em que o polinucleotídeo é transcrito, e a transcrição é traduzida, para gerar a proteína de fusão. A ligação de polipeptídeo e a clivagem de polipeptídeo, transjunção, podem também estar envolvidas na expressão de uma proteína em uma célula. Os métodos para liberação de polipeptídeo e polinucleotídeo para células são apresentados em

outra parte na descrição.

[037] Para os propósitos da presente descrição, um "gene" inclui uma região de DNA que codifica um produto de gene (veja infra), bem como todas as regiões de DNA que regulam a produção do produto de gene, se ou não tais sequências reguladoras são adjacentes à codificação e/ou sequências transcritas. Conseqüentemente, um gene inclui, porém não está necessariamente limitado a, sequências promotoras, terminadores, sequências reguladoras translacionais tais como sítios de ligação de ribossomo e sítios internos de entrada de ribossomo, realçadores, silenciadores, isoladores, elementos de fronteira, origens de replicação, sítios de ligação de matriz e regiões de controle de local.

[038] "Expressão de gene" refere-se à conversão da informação, contida em um gene, em um produto de gene. Um produto de gene pode ser o produto transcricional direto de um gene (por exemplo, mRNA, tRNA, rRNA, RNA antissentido, RNA de interferência, ribozima, RNA estrutural ou qualquer outro tipo de RNA) ou uma proteína produzida por translação de um mRNA. Os produtos de gene também incluem RNAs que são modificados, por processos tais como tampoamento, poliadenilação, metilação, e edição, e proteínas modificadas por, por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação, miristilação, e glicosilação.

[039] Os métodos e composições descritos incluem proteínas de fusão compreendendo um domínio de clivagem e um domínio de ligação de DNA (ZFP) em que o domínio de ligação de DNA ligando-se a uma sequência no loco E32 direciona a atividade do domínio de clivagem para a vizinhança da sequência e, conseqüentemente, induz a uma ruptura de filamento duplo) no loco E32. Como apresentado em outra parte nesta descrição, um domínio de dedo de zinco pode ser planejado para se ligar virtualmente a qualquer sequência desejada. Conseqüentemente, um ou mais domínios de ligação de DNA podem

ser planejados para se ligar a um ou mais sequências no loco E32. A expressão de uma proteína de fusão compreendendo um domínio de ligação de DNA e um domínio de clivagem em uma célula realiza a clivagem em ou perto do sítio alvo.

[040] A seleção de um sítio alvo no loco E32 para ligação por um domínio de dedo de zinco pode ser realizada, por exemplo, de acordo com os métodos descritos na Patente dos Estados Unidos 6.453.242 que também descreve os métodos para projetar ZFPs para se ligarem a uma sequência selecionada. Estará claro para aqueles versados na técnica que a inspeção visual de uma sequência de nucleotídeo pode também ser usada para seleção de um sítio alvo. Conseqüentemente, qualquer meio para seleção de sítio alvo pode ser usado nos métodos descritos aqui.

[041] Para os domínios de ligação de DNA de For, os sítios alvejados são geralmente compostos de vários subsítios alvos adjacentes. Um subsítio alvo refere-se à sequência, geralmente tripleto de nucleotídeo ou um quarteto de nucleotídeo que pode se sobrepor por um nucleotídeo com um quarteto adjacente, isto é, ligado por um dedo de zinco individual. Veja, por exemplo, WO 02/077227. O filamento com o qual uma proteína de dedo de zinco faz a maioria dos contatos é designado o filamento alvo "filamento de reconhecimento primário", ou "filamento de contato primário", algumas proteínas de dedo de zinco ligam-se a um tripleto de três bases no filamento alvo e uma quarta base no filamento não alvo. Um sítio alvo geralmente tem um comprimento de pelo menos 9 nucleotídeos e, conseqüentemente, é ligado por um domínio de ligação de dedo de zinco compreendendo pelos menos três dedos de zinco. Entretanto, a ligação de, por exemplo, um domínio de ligação de 4 dedos a um sítio alvo de 12 nucleotídeos, um domínio de ligação de 5 dedos a um sítio alvo de 15 nucleotídeos ou um domínio de ligação de 6 dedos a um sítio alvo de 18 nucleotídeos,

é também possível. Como será evidente, a ligação de domínios de ligação alvos (por exemplo, 7, 8, 9 dedos ou mais) a sítios alvos mais longos é também consistente com a invenção.

[042] Não é necessário para um sítio alvo ser um múltiplo de três nucleotídeos. Em casos em que interações de filamento cruzado ocorrem (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos 6.453.242 e WO 02/077227), um ou mais dos dedos de zinco individuais de um domínio de ligação de múltiplos dedos podem se ligar à sobreposição de subsítios quadrúplos. Como resultado, uma proteína de três dedos pode se ligar a uma sequência de 10 nucleotídeos, em que o décimo nucleotídeo é parte de uma ligação quadrúpla por um dedo terminal, uma proteína de quatro dedos pode se ligar a uma sequência de 13 nucleotídeos, em que o décimo terceiro nucleotídeo é parte de uma ligação quadrúpla por um dedo terminal, etc.

[043] O comprimento e natureza de sequências de ligante de aminoácido entre dedos de zinco individuais em um domínio de ligação de múltiplos dedos também afeta a ligação a uma sequência alvo. Por exemplo, a presença de um assim chamado "ligante não canônico", "ligante longo" ou "ligante estruturado" entre dedos adjacentes em um domínio de ligação de múltiplos dedos pode permitir que aqueles dedos se liguem aos subsítios que não são imediatamente adjacentes. Os exemplos não limitantes de tais ligantes são descritos, por exemplo, nas patentes dos Estados Unidos n^{os} 6.479.626 e WO 01/53480. Consequentemente, um ou mais subsítios, em um sítio alvo para um domínio de ligação de dedo de zinco, podem ser separados um do outro por 1, 2, 3, 4, 5 ou mais nucleotídeos. Para fornecer, porém, um exemplo, um domínio de ligação de quatro dedos pode se ligar a um sítio alvo de 13 nucleotídeos compreendendo, em sequência, dois subsítios de 3 nucleotídeos, um nucleotídeo intermediário, e dois subsítios tripletos contíguos.

[044] A distância entre sítios alvos refere-se ao número de nucleotídeos ou pares de nucleotídeo intermediando entre dois sítios alvos conforme medido a partir das fronteiras das sequências mais próximas uma da outra. Em certas modalidades em que a clivagem depende da ligação de duas moléculas de fusão de meio domínio de clivagem/ domínio de dedo de zinco para separar sítios alvos, os dois sítios alvos podem ser filamentos de DNA opostos. Em outras modalidades, ambos os sítios alvos são no mesmo filamento de DNA.

[045] Para a integração alvejada no loco E32, uma ou mais ZFPs são planejadas para se ligarem a um sítio alvo em ou próximo do sítio de clivagem predeterminado, e uma proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação de DNA planejado e um domínio de clivagem é expressa na célula. Na ligação da porção de dedo de zinco da proteína de fusão ao sítio alvo, o DNA é clivado, preferivelmente por meio de uma ruptura de filamento duplo, próxima do sítio alvo pelo domínio de clivagem.

[046] A presença de uma ruptura de filamento duplo no loco de Evento32 facilita a integração de sequências exógenas por meio de recombinação homóloga ou por meio de mecanismos de reparo direcionados não homologia. Desse modo, o polinucleotídeo compreendendo a sequência exógena a ser inserida no loco de Evento32 incluirá uma ou mais regiões de homologia com E32 para facilitar a recombinação homóloga.

[047] Além das moléculas de fusão descritas aqui, a substituição alvejada de uma sequência genômica selecionada também envolve a introdução de uma sequência doadora. A sequência doadora pode ser introduzida na célula antes da, concorrentemente com, ou subsequente a, expressão da(s) proteína(s) de fusão. O polinucleotídeo doador contém homologia suficiente com E32 para suportar a recombinação homóloga entre ele e a sequência genômica de E32 para qual ele

transporta a homologia. Aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000 nucleotídeos ou mais de homologia de sequência entre um doador e uma sequência genômica, ou qualquer valor integral entre 10 e 2.000 nucleotídeos ou mais, suportará recombinação homóloga. Em certas modalidades, os braços de homologia são menores do que 1.000 pares de base em comprimento. Em outras modalidades, os braços de homologia são menores do que 750 pares de base em comprimento.

[048] As sequências doadoras podem abranger em comprimento de 10 a 50.000 pares de base ou qualquer valor integral de nucleotídeos entre ou mais longo. Ficará facilmente evidente que a sequência doadora é tipicamente não idêntica à sequência genômica que ela substitui. Além disso, as sequências doadoras podem compreender uma molécula de vetor contendo sequências que não são homólogas à região substituída. Geralmente, a(s) região(ões) homóloga(s) da sequência doadora terá(ão) pelos menos 50 % de identidade de sequência com uma sequência genômica com a qual a recombinação é desejada. Em certas modalidades, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,9 % de identidade de sequência estão presentes. Qualquer valor entre 1 % e 100 % de identidade de sequência pode estar presente, dependendo do comprimento do polinucleotídeo.

[049] Uma molécula doadora pode conter várias regiões descontínuas de homologia com cromatina celular. Por exemplo, para inserção alveja de sequências não normalmente presentes em uma região de interesse, as referidas sequências podem estar presentes em uma molécula doadora de ácido nucléico e flanqueadas por regiões de homologia com uma sequência de gene na região de interesse.

[050] As moléculas doadoras podem também ser inseridas no loco E32 para servir como um reservatório para uso posterior. Por exemplo, uma molécula doadora contendo uma mutação de interesse

pode ser inserida no loco E32. Em seguida, as ZFNs específicas ao gene de interesse podem ser introduzidas, em que clivarão tanto o local endógeno quanto a molécula doadora no loco E32 que contém a mutação de interesse. A ruptura de filamento duplo resultante no genoma pode em seguida se tornar o sítio de integração para a molécula doadora liberada do loco E32. Deste modo, a eficácia de integração alvejada da sequência doadora em qualquer região de interesse pode ser grandemente aumentada, visto que o método não depende da captação simultânea de ambos os ácidos nucleicos que codificam os ZFNs e aquelas sequências doadoras.

[051] As moléculas doadoras podem também ser inseridas no loco E32 para servirem como um sítio alvo para interações subsequentes. Por exemplo, uma molécula doadora compreendida de sequências de DNA que contêm sítios de reconhecimento para projetos de ZFN adicionais pode ser inserida no local. Subsequentemente, os projetos de ZFN adicionais podem ser gerados e expressos em células de tal forma que a molécula doadora original é clivada e modificada por recombinação homóloga ou de reparo. Desta maneira, as interações reiterativas de moléculas doadoras podem ocorrer no loco E32.

[052] Qualquer sequência exógena pode ser introduzida no loco E32 como descrito aqui. As sequências exógenas exemplares incluem, porém não limitadas a qualquer sequência de codificação de polipeptídeo (por exemplo, cDNAs), promotor, realçador e outras sequências reguladoras (por exemplo, sequências de RNA de interferência, cassetes de expressão de shRNA, rótulos de epítipo, genes marcadores, sítios de reconhecimento de enzima de clivagem e vários tipos de constructos de expressão. Tais sequências podem ser facilmente obtidas usando técnicas biológicas moleculares padrões (clonagem, síntese, etc.) e/ou são comercialmente disponíveis.

[053] Para expressar ZFNs, as sequências que codificam as pro-

teínas de fusão são tipicamente subclonadas em um vetor de expressão que contém um promotor para transcrição direta. Os promotores eucarióticos e bacterianos adequados são bem conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Sambrook, e outro, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª edição, 1989; 3.sup.rd ed., 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); e *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, e outro, supra. Bacterial expression systems for expressing the ZFNs are available in, por exemplo, *E. coli*, *Bacillus* sp., and *Salmonella* (Palva, e outro, *Gene* 22:229-235 (1983)). Os kits para tais sistemas de expressão são comercialmente disponíveis. Sistemas de expressão eucarióticos para células de mamífero, levedura, e células de inseto são bem conhecidas por aqueles versados na técnica e são também comercialmente disponíveis.

[054] O vetor de expressão particular usado para transportar o material genético na célula é selecionado com relação ao uso destinado das proteínas de fusão, por exemplo, expressão em plantas, animais, bactérias, fungos, protozoários, etc. (veja os vetores de expressão descritos abaixo). Os vetores de expressão animais e bacterianos padrões são conhecidos na técnica e são descritos com detalhe, por exemplo, Publicação de Patente dos Estados Unidos 20050064474A1 e as publicações de Patente Internacional WO05/084190, WO05/014791 e WO03/080809.

[055] Os métodos de transfecção padrão podem ser usados para produzir linhagens de célula bacteriana, de mamífero, de levedura ou de inseto que expressam grandes quantidades de proteína, que podem em seguida ser purificadas usando técnicas padrão (veja, por exemplo, Colley, e outro, *J. Biol. Chem.* 264:17619-17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, in *Methods in Enzymology*, volume 182 (Deutscher, edição, 1990)). A transformação de células eucarióticas e procarióticas é realizada de acordo com técnicas padrão (veja, por

exemplo, Morrison, J. *Bact.* 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* 101:347-362 (Wu, e outro, edições, 1983).

[056] Qualquer um dos procedimentos bem conhecidos para introduzir seqüências de nucleotídeo estranhas em tais células hospedeiras pode ser usado. Estes incluem o uso de transfecção de fosfato de cálcio, polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, métodos ultrassônicos (por exemplo, sonoporação), lipossomas, microinjeção, DNA nu, vetores de plasmídeo, vetores virais, ambos epissômicos e integradores, e qualquer um dos outros métodos conhecidos para introduzir DNA genômico clonado, cDNA, DNA sintético ou outro material genético estranho em uma célula hospedeira (veja, por exemplo, Sambrook, e outro, *supra*). É apenas necessário que o procedimento de planejamentos genético particular usado seja capaz de sucessivamente introduzir pelo menos um gene na célula hospedeira capaz de expressar a proteína de escolha.

[057] Como observado acima, as constructos de DNA podem ser introduzidas no genoma de uma espécie de planta desejada por várias técnicas convencionais. Para revisão de tais técnicas veja, por exemplo, Weissbach & Weissbach *Methods for Plant Molecular Biology* (1988, Academic Press, N.Y.) Section VIII, páginas 421 a 463; e Grierson & Corey, *Plant Molecular Biology* (1988, 2ª edição), Blackie, London, Ch. 7-9.

[058] Um constructo de DNA pode ser introduzido diretamente no DNA genômico da célula de planta usando técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de célula de planta, ou os constructos de DNA podem ser introduzidos diretamente no tecido de planta usando métodos biolísticos, tal como bombardeio de partícula de DNA (veja, por exemplo, Klein, e outro, (1987) *Nature* 327:70-73). Alternativamente, o constructo de DNA pode ser introduzido na célula de planta por meio da transformação de nanopartícula (veja, por exemplo,

Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20090104700, que é incorporada aqui por referência em sua totalidade). Alternativamente, os constructos de DNA podem ser combinados com fronteira de T-DNA/regiões de flaqueamento adequadas e introduzidas em um vetor hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens* convencional. As técnicas de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo desarmamento e uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica. Veja, por exemplo, Horsch, e outro, (1984) Science 233:496-498, e Fraley, e outro. (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. Estados Unidos da América 80:4803.

[059] Além disso, a transferência de gene pode ser obtida usando bactérias não *Agrobacterium* ou viroses tais como *Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, vírus X da batata, vírus do mosaico da couve-flor e vírus do mosaico da nervura da mandioca e/ou vírus do mosaico do tabaco, veja, por exemplo, Chung, e outro, (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4.

[060] As funções de virulência do hospedeiro de *Agrobacterium tumefaciens* direciona a inserção de um filamento de T contendo a constructo e o marcador adjacente no DNA da célula de planta quando a célula é infectada pelas bactérias usando vetor de DNA de T binário (Bevan (1984) Nuc. Acid Res. 12:8711-8721) ou o procedimento de co-cultivo (Horsch, e outro, (1985) Science 227:1229-1231). Geralmente, o sistema de transformação de *Agrobacterium* é usado para planejar as plantas dicotiledôneas (Bevan, e outro, (1982) Ann. Rev. Genet. 16:357-384; Rogers, e outro, (1986) Methods Enzymol. 118:627-641). O sistema de transformação de *Agrobacterium* pode também ser usado para transformar, bem como transferir, DNA para plantas monocotiledôneas e células de planta. Veja a Patente dos Estados Unidos nº 5.591.616; Hernalsteen, e outro, (1984) EMBO J. 3:3039-3041; Hooykass-Van Slogteren, e outro, (1984) Nature 311:763-764; Grimsley, e outro, (1987) Na-

ture 325:1677-179; Boulton, e outro, (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:31-40; e Gould, e outro, (1991) *Plant Physiol.* 95:426-434.

[061] Os métodos alternativos de transformação e transferência incluem, porém não são limitados a, transformação de protoplasto através de captação mediada por cálcio, polietileno glicol (PEG) ou eletroporação de DNA nu (veja Paszkowski, e outro, (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722, Potrykus, e outro, (1985) *Molec. Gen. Genet.* 199:169-177; Fromm, e outro, (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos da América* 82:5824-5828; e Shimamoto (1989) *Nature* 338:274-276) e eletroporação de tecidos de planta (D'Halluin, e outro, (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505). Os métodos adicionais para transformação de célula de planta incluem microinjeção, captação de DNA medida por carboneto de silício (Kaeppler, e outro, (1990) *Plant Cell Reporter* 9:415-418), e bombardeio de microprojétil (veja Klein, e outro, (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos da América* 85:4305-4309; e Gordon-Kamm, e outro, (1990) *Plant Cell* 2:603-618).

[062] Os métodos e composições descritos podem ser usados para inserir sequências exógenas em uma localização predeterminada tal como o loco E32. Isto é útil na medida em que a expressão de um transgene introduzido no genoma de milho depende criticamente de seu sítio de integração. Conseqüentemente, os genes que codificam a tolerância a herbicida, resistência a inseto, nutrientes, antibióticos ou moléculas terapêuticas podem ser inseridos, por recombinação alvejada.

[063] As células de planta transformadas que são produzidas por quaisquer das técnicas de transformação acima podem ser cultivadas para gerar uma planta inteira que possui o genótipo transformado e, desse modo, o fenótipo desejado. Tais técnicas de regeneração dependem da manipulação de certos fitormônios em um meio de crescimento de cultura de tecido, tipicamente dependendo de um marcador biocida e/ou herbicida que foi introduzido junto com as sequências de

nucleotídeo desejadas. A regeneração de planta a partir de protoplastos cultivados é descrita em Evans, e outro, " Protoplasts Isolation and Culture" in Handbook of Plant Cell Culture, páginas 124 a 176, Macmillian Publishing Company, Nova Iorque, 1983; e Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplastos, páginas 21 a 73, CRC Press, Boca Raton, 1985. A regeneração pode também ser obtida a partir do calo, explantes, órgãos, pólenes, embriões da planta ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee e outro (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486.

[064] Alguém versado na técnica reconhecerá que após a sequência exógena estar estavelmente incorporada em plantas transgênicas e confirmada ser operável, ela poderá ser introduzida em outras plantas por cruzamento sexual. Qualquer uma das várias técnicas de geração padrões pode ser usada, dependendo das espécies a serem cruzadas.

[065] Uma célula, calo, tecido ou planta de milho transformada pode ser identificada e isolada selecionando ou peneirando-se o material de planta planejado para traços codificados pelos genes presentes na transformação do DNA. Por exemplo, a seleção pode ser realizada desenvolvendo-se o material de planta planejado em meios contendo uma quantidade inibidora do antibiótico ou herbicida ao qual o constructo de gene de transformação confere resistência. Além disso, as células transformadas podem também ser identificadas por peneiragem para as atividades de quaisquer genes marcadores visíveis (por exemplo, a beta-glucuronidase, luciferase, B ou C1 genes) que podem estar presentes nos constructos de ácido nucleico recombinante. Tais metodologias de peneiragem e seleção são bem conhecidas por aqueles versados na técnica.

[066] Os métodos físicos e bioquímicos também podem ser usados para identificar os transformantes de planta ou células de planta

contendo constructos de gene inseridos. Estes métodos incluem, porém não são limitados a: 1) análise de *Southern* ou amplificação de PCR para detectar e determinar a estrutura da inserção de DNA recombinante; 2) *Northern blot*, proteção de S1 RNase, extensão de iniciador ou amplificação de transcriptase reversa-PCR para detectar e examinar transcrições de RNA dos constructos de gene; 3) os ensaios enzimáticos para detectar atividade de enzima ou ribozima, onde tais produtos de gene são codificados pelo constructo de gene; 4) eletroforese em gel de proteína, técnicas de *Western blot*, imunoprecipitação, ou imunoenaios ligados por enzima (ELISA), onde os produtos de constructo de gene são proteínas. As técnicas adicionais, tais como hibridização *in situ*, manchamento de enzima, e imunomanchamento, também podem ser usadas para detectar a presença ou expressão da constructo recombinante em órgãos e tecidos de planta específicos. Os métodos para fazer todos estes ensaios são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

[067] Os efeitos de manipulação de gene usando os métodos descritos aqui podem ser observados por, por exemplo, *northern blots* do RNA (por exemplo, mRNA) isolado dos tecidos de interesse. Tipicamente, se o mRNA estiver ou a quantidade de mRNA tiver aumentado, pode-se assumir que o transgene correspondente está sendo expresso. Outros métodos de medição de gene e/ou atividade de polipeptídeo codificado pode ser usada. Diferentes tipos de ensaios enzimáticos podem ser usados, dependendo do substrato usado e do método de detecção do aumento ou decréscimo de um produto de reação ou subproduto. Além disso, os níveis de polipeptídeo expressos podem ser medidos imuniquimicamente, isto é, ELISA, RIA, EIA e outros ensaios baseados em anticorpo bem conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como ensaios de detecção eletroforéticos (com manchamento ou *western blotting*). Como um exemplo não limitante, a

detecção das proteínas de AAD-1 (ariloxialcanato dioxigenase; veja WO 2005/107437) e PAT (fosfinotricin-N-acetil-transferase (PAT), EC 2.3.1.183) usando um ensaio de ELISA é descrita na publicação de Patente dos Estados Unidos nº 20090093366 que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. O transgene pode ser seletivamente expresso em alguns tecidos da planta ou em alguns estágios de desenvolvimento, ou o transgene pode ser expresso em, substancialmente, todos os tecidos de planta, substancialmente, ao longo de todo seu ciclo de vida. Entretanto, qualquer modo de expressão combinatório é também possível.

[068] A presente descrição também abrange sementes das plantas transgênicas descritas acima em que a semente tem o constructo de transgene ou gene. A presente descrição também abrange progênie, clones, linhagens celulares ou células das plantas transgênicas descritas acima em que os referidos progênie, clone, linhagem celular ou célula tem o constructo de transgene ou gene.

[069] A administração de quantidades eficazes é, por qualquer uma das retinas, normalmente, usada para introduzir proteínas de fusão no contato final com a célula de planta a ser tratada. Os ZFPs são administrados de qualquer maneira adequada, preferivelmente com veículos aceitáveis. Os métodos adequados de administrar tais moduladores são disponíveis e bem conhecidos por aqueles versados na técnica, e, embora mais do que uma rotina possa ser usada para administrar uma composição particular, uma rotina particular pode frequentemente fornecer uma reação mais imediata e mais eficaz do que outra rotina.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Produção de Proteínas de Dedo de Zinco Projetados para se ligarem ao Loco genômico para Evento de Milho DAS-59132

[070] As proteínas de dedo de zinco direcionadas contra sequências de DNA que compreendem o loco genômico para Evento de Milho

DAS-59132 (veja, Figura 1) foram projetadas pelos métodos descritos em Urnov, e outro, (2005) Nature 435:646-651. A sequência alvo exemplar e os hélices de reconhecimento são mostrados na Tabela 1A (planejamentos de regiões de hélice de reconhecimento) e Tabela 1B (sítios alvos). Na Tabela 1B, os nucleotídeos no sítio alvo que são conectados pelas hélices de reconhecimento de ZFP são indicados em letras maiúsculas; nucleotídeos não conectados são indicados em letra minúscula.

Tabela 1A

[071] Loco genômico para planejamentos de dedo de zinco de ligação de Evento de Milho DAS-59132.

ZFP#	F1	F2	F3
25716	RSDDLK SEQ ID NO:43	QSGSLTR SEQ ID NO:44	RSDNLRE SEQ ID NO:45
25717	RSADRKT SEQ ID NO:48	DRSHLSR SEQ ID NO:49	TSGNLTR SEQ ID NO:50

Tabela 1A -continuação-

ZFP#	F4	F5
25716	QSGDLTR SEQ ID NO:46	DTGARLK SEQ ID NO:47
25717	RSDDLKSR SEQ ID NO:51	QSANRTK SEQ ID NO:52

Tabela 1B

Sequências Alvo para proteínas de dedo de zinco.

Número de Dedo de Zinco	SEQ ID NO:	Sequência Alvo
25686	2	caCAACAAGACtGCGGGTtcggtggcgc
25687	3	gaTAGGTGGCAGTGGCAgtggcactggc
25688	4	taTCGGCACAACAAGACTgcggttcgg
25689	5	tgGCAGTGGCAGTGGCActggcacggca
25692	6	caGCAGATGAGcGGAGCGatcgatcgcg
25693	7	caGTGGATAGAGCAGCGttggccgttg

Número de Dedo de Zinco	SEQ ID NO:	Sequência Alvo
25710	8	agGAAGCCGGCGGTGAAAtgtcgccgtgt
25711	9	cgTCGCCAcTCGGCACAAggctcatcag
25712	10	atCGGGCATCGGCGACTgatgagccttg
25713	11	gaTCAACGGAAGCGGATGGCccgcttct
25716	12	tgATCGCAAtCGGGCATCGgcgactgatg
25717	13	cgGAAGCGGATGGCCCGcttcttagaa

[072] Os planejamentos de proteína de dedo de zinco de E32 foram incorporados em vetores que codificam uma proteína tendo pelos menos um dedo com uma estrutura de CCHC. Veja, Publicação de Patente dos Estados Unidos nº 2008/0182332. Em particular, o último dedo em cada proteína tinha um esqueleto de CCHC para hélice de reconhecimento. As sequências de codificação de dedo de zinco não canônicas foram fundidas ao domínio de nuclease da enzima FokI de restrição do tipo IIS (aminoácidos 384-579 da sequência de Wah, e outro, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos da América 95: 10564-10569) por meio de um marcador de ZC de quatro aminoácidos e um sinal de localização nuclear *opaco-2* de *Zea mays* para formar nucleases de dedo de zinco de Evento de Milho DAS-59132 (ZFNs). Os dedos de zinco ideais foram verificados quanto à atividade de clivagem usando um sistema baseado em levedura de brotamento anteriormente mostrado para identificar nucleases ativas. Veja, por exemplo, Publicação de Patente dos Estados Unidos nº 20090111119; Doyon, e outro, (2008) *Nat Biotechnol.* 26:702–708; Geurts, e outro, (2009) *Science* 325:433. Os dedos de zinco para os vários domínios funcionais foram selecionados para uso *in-vivo*. Dos números ZFNs que foram projetados, produzidos e testados para se ligarem aos sítios alvos de polinucleotídeo genômico de Evento de Milho DAS-59132 putativos, seis pares de ZFNs foram identificados como tendo atividade *in vivo* em níveis elevados, e selecionados para outra experimentação.

Veja, Tabela 1A. Os pares de ZFN selecionados que opcionalmente se ligam ao loco E32 foram avançados para teste em um ensaio de transformação de milho transitório.

[073] A Figura 1 mostra a organização genômica do loco E32 em relação aos sítios de ligação/alvo de polinucleotídeo de ZFN dos seis pares de ZFN. Os três primeiros pares de ZFN (E32 ZFN1, E32 ZFN2, e E32 ZFN3) ligam-se a montante da inserção transgênica de Evento de Milho DAS-59132, os segundos três pares de ZFN (E32 ZFN4, E32 ZFN5, e ZFN6 DE E32) ligam-se a jusante da inserção transgênica de Evento de Milho DAS-59132. Os quatro ZFNs foram caracterizados como sendo capazes de eficazmente se ligarem a e clivarem sítios alvos de polinucleotídeo genômico de Evento de Milho DAS-59132 em planta.

EXEMPLO 2: Constructos de Nuclease de Dedo de Zinco e Constructo de Doador de Gene AAD-1

[074] Os vetores de plasmídeo contendo constructos de expressão de ZFN das seis nucleases de dedo de zinco exemplares foram projetados e construídos usando a habilidade comumente praticada na técnica. Cada sequência de codificação de dedo de zinco foi fundida a uma sequência que codifica um sinal de localização nuclear opaco-2 (Maddaloni, e outro, (1989) *Nuc. Acids Res.* 17(18):7532), que foi posicionado a montante da nuclease de dedo de zinco.

[075] O sinal de localização nuclear opaco-2 e a sequência de fusão de nuclease de dedo de zinco foram pareados com o sinal de localização nuclear opaco-2 complementar e a sequência de fusão de nuclease de dedo de zinco. Como tal, cada constructo consistia em uma estrutura de leitura aberta única compreendida de dois sinais de localização nuclear opaco-2 e sequências de fusão de nuclease de dedo de zinco separadas pela sequência 2A de vírus *Thosea asigna* (Mattion, e outro, (1996) *J. Virol.* 70:8124-8127). A expressão da sequência de codificação de ZFN foi regulada pelo promotor de Ubiquiti-

na 1 de *Zea mays* de alta expressão (Christensen, e outro, (1992) *Plant Mol. Biol.* 18(4):675-89) e flanqueado pela região não translada da por 5' 3' poliA de *Zea mays* (Patente dos Estados Unidos 6.699.984). Os seis constructos de plasmídeo resultantes foram confirmados por meio de digestão de enzima de restrição e por meio de sequenciamento de DNA. As figuras 2 e 3 fornecem uma representação gráfica dos constructos de plasmídeo completados. O ZFN expresso em constructo de plasmídeo, pDAB105906 (Figura 2), contém "Fok-Mono" que é uma FokI endonuclease do tipo. O ZFN expresso em constructo de plasmídeo, pDAB111809 (Figura 3), contém "Fok1-ELD" que é uma FokI endonuclease modificada. A FokI endonuclease modificada contém alterações como descrito em Doyon Y., Vo T., Mendel M., Greenberg S., Wang J., Xia D., Miller J., Urnov F., Gregory P., and Holmes M. (2010) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architecture. *Nature Methods*, 8(1); 74-79.

[076] Um constructo doador foi projetado para se integrar no DNA genômico clivado de ZFN do loco E32. A figura 4 ilustra o constructo doador, pDAB100655, que consiste em um cassete de expressão de gene único. Este cassete de expressão de gene único é compreendido do promotor de Ubiquitina 1 de *Zea mays* (promotor de ZmUbi1), a sequência de codificação de AAD-1 (Patente dos Estados Unidos nº 7.838.733) e a região não translada por 5' 3' de *Zea mays* (ZmPer5 3' UTR). O constructo contém um par de sequências de ligação de Evento de Milho DAS-59132 ZFN6 repetido que foi incluído a jusante do cassete de expressão de gene AAD-1. Os vários elementos de gene foram agrupados em um plasmídeo baseado em pUC de número de cópia elevado.

EXEMPLO 3: Transformação Transitória de Culturas de Hi-II de Milho Para Determinar a Eficácia de ZFN

Transformação de genes de ZFN

[077] As culturas embriogênicas de Hi-II de milho foram produzidas

como descrito na Patente dos Estados Unidos 7.179.902 e foram usadas para avaliar e testar as eficácias dos diferentes ZFNs. O DNA de plasmídeo consistindo em pDAB105901, pDAB105902, pDAB105903, pDAB105904, pDAB105905 e pDAB105906 foi transitoriamente transformado em células de calo de milho para comparar a frequência de corte de diferentes ZFNs contra um ZFN testado padrão, pDAB7430, que foi projetado para o loco de gene de inositol polifosfato 2-cinase dentro do genoma de milho como descrito no Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 2011/0119786.

[078] A partir das culturas de Hi-II, 12 mL de volume globular (PCV) de linhagem celular previamente crio-preservada mais 28 mL de meio condicionado foram subcultivados em 80 mL de meio líquido de GN6 (meio de N6 (Chu, e outro, (1975) Sci Sin. 18:659–668), 2,0 mg/L 2, 4-D, 30 g/L de sacarose, pH 6,0) em um frasco de Erlenmeyer de 500 mL, e colocados em um agitador a 125 rpm a 28°C . Esta etapa foi repetida duas vezes usando a mesma linhagem celular, de tal forma que um total de 36 mL de PCV foi distribuído através de três frascos. Após 24 horas, os teores foram despejados em um prato de PETRI™ estéril e os meios líquidos de GN6 foram removidos. O calo levemente umedecido foi transferido para um círculo de 2,5 cm de diâmetro em meio sólido de GN6 S/M (meio de N6 (Chu, e outro, (1975) Sci Sin. 18:659-668), 2,0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarose, 45,5 g/L de sorbitol, 45,5 g/L de manitol, 100 mg/L de mio-inositol, 2,5 g/L de Gelrite™, pH 6,0) contendo papel de filtro. As placas foram incubadas no escuro durante 4 horas a 28° C.

[079] Micropartícula de ouro (0,6 micron, BioRad, Hercules, CA,) foi preparada para precipitação de DNA pesando-se 21 mg em um tubo de microcentrífuga de 1,7 mL siliconizado, estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 350 µL de etanol a 100 % gelado foram adicionados e turbilhonado durante 1 minuto. O ouro foi peletizado por centrifugação

a 10.000 rpm durante 15 segundos usando uma centrífuga MINIS-PIN™ (Eppendorf, Hauppauge, NY). Após remoção do sobrenadante, 350 µL de água estéril, gelada foram adicionados, misturados para cima e para baixo com a pipeta e centrifugados a 10.000 rpm durante 15 segundos. A etapa de lavagem foi repetida mais uma vez antes da suspensão do ouro em 350 µL de água estéril, gelada. O outro lavado foi em seguida armazenado a -20°C até necessário.

[080] Para cada precipitação de DNA, 3 mg de ouro em 50 µL de água foram colocados em alíquota em um tubo de centrifuga de 1,7 mL siliconizado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O DNA de plasmídeo (2,5 µg de ZFN de E32 em plasmídeos pDAB105901, pDAB105902, pDAB105903, pDAB105904, pDAB105905 ou pDAB105906 e 2,5 µg de IPK1 ZFN em plasmídeo pDAB7430) foi pré-misturado em 0,6 mL de tubos de microcentrifuga (Fisher Scientific, Nazareth, PA) e adicionados à suspensão de ouro suavemente pipetando para cima e para baixo 5 a 10 vezes para misturar completamente. Vinte microlitros (20 µL) de espermidina a 0,1 M fria foram em seguida adicionados e suavemente misturados por pipetagem para cima e para baixo 5 a 10 vezes. Cinquenta microlitros (50 µL) de cloreto de cálcio a 2,5 M gelado foram adicionados lentamente e suavemente misturados por pipetagem para cima e para baixo 5 a 10 vezes. O tubo foi em seguida tampado e deixado incubar em temperatura ambiente durante 10 minutos. Após centrifugação durante 15 segundos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e 60 µL de etanol a 100 %, gelado, foi adicionado. A mistura de DNA de ouro foi ressuspensa suavemente pipetando-se para cima e para baixo 5 a 10 vezes.

[081] Para bombardeio de micropartícula, macroveículos esterilizados (BioRad, Hercules, CA) foram ajustados em suportes de aço inoxidável (BioRad, Hercules, CA) e autoclavados. Nove microlitros (9 µL) de ouro/suspensão de DNA foram uniformemente espalhados no

centro do macroveículo sendo certo para pipetar para cima e para baixo a fim de manter a suspensão bem misturada entre as alíquotas. Os macroveículos foram em seguida colocados sobre uma peça de papel de filtro Whatman #4 de 125 mm estéril (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) em um leito de DRIERITE™ malha 8 (W.A Hammond Drierite Co., Xenia, OH) em um prato de PETRI™ de vidro de 140 x 25 mm. O ouro/DNA foi deixado secar completamente durante cerca de 5 a 10 minutos. Os discos de ruptura ($77,33 \text{ kg/cm}^2$ (1.100 psi), BioRad, Hercules, CA) foram esterilizados por embebição durante alguns segundos em álcool isopropílico em seguida carregados na capa de retenção de um dispositivo de bombardeio de micropartícula (PDS-1000, BioRad, Hercules, CA). Uma tela de interrupção autoclavada (BioRad, Hercules, CA) e um macroveículo carregado foram colocados na montagem de lançamento, a tampa foi parafusada sobre e colocada na câmara de bombardeio justamente sob o bico. O prato de PETRI™ contendo o alvo foi descoberto e colocado na câmara de bombardeio de 6 cm abaixo do bico. Um vácuo foi puxado (-0,9 bar) e o dispositivo foi destituído. As etapas descritas acima foram repetidas para cada alvo jateado. Os alvos foram incubados no escuro em uma temperatura de 28°C durante 24 horas no mesmo meio jateado. As células jateadas foram transferidas para recuperar o meio de recuperação sólido de GN6 (meio de N6 (Chu, e outro, (1975) Sci Sin. 18:659–668), 2,0 mg/L 2, 4-D, 30 g/L de sacarose, 2,5 g/L de Gelrite, pH 6,0) e incubadas durante mais 48 horas a 28°C no escuro. Setenta e duas horas após o bombardeio, as células foram colhidas em EPENDORF MICROFUGE SAFE LOCK TUBES™ de 2 mL e liofilizadas durante 48 horas em um VIRTIS MODEL # 50L VIRTUAL XL-70 LYOPHILIZER™ (SP Scientific, Gardiner NY).

Análise de sequenciamento de geração seguinte (NGS) de milho transitoriamente transformado

[082] O tecido de calo de milho transitoriamente transformado foi analisado para determinar a eficácia de clivagem das proteínas de nuclease de dedo de zinco.

Preparação de amostra

[083] O tecido de calo de milho transitoriamente transformado com os constructos de ZFN e os dois vetores de controle, pDAB100664 e pDAB100665, foram coletados em tubos de EPPENDORF™ de 2 mL e liofilizados durante 48 horas. O DNA genômico (gDNA) foi extraído do tecido liofilizado usando o QIAGEN PLANT DNA EXTRACTION KIT™ (Valencia, CA) de acordo com as especificações do fabricante. O gDNA isolado foi ressuspensão em 200 µL de água e a concentração foi determinada usando um espectrofotômetro de NANODROP® (Invitrogen, Carlsbad, CA). A integridade do DNA foi estimada executando-se as amostras em E-géis de 0,8 % de agarose (Invitrogen). As amostras de gDNA foram normalizadas (25 ng/µL) para amplificação de PCR para gerar amplicons que seriam analisados por meio de sequenciamento de ILLUMINA™ (San Diego, CA).

[084] Os iniciadores de PCR para amplificação das regiões genômicas que abrangem cada sítio de clivagem de ZFN testado e as amostras de controle foram adquiridos do Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). As condições de amplificação ideais para os iniciadores serem identificados por PCR em gradiente de temperatura usando 0,2 µM de iniciadores apropriados, ACCUPRIME PFX SUPERMIX™ (1,1X, Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico padrão em uma reação de 23,5 µL. Os parâmetros de ciclo foram desnaturação inicial a 95° C (5 minutos) seguida por 35 ciclos de desnaturação (95°C, 15 segundos), anelamento (55-72° C, 30 segundos), extensão (68°C, 1 minuto) e uma extensão final (72°C, 7 min). Os produtos de amplifica-

ção foram analisados em géis de agarose de TAE a 3,5%. Após identificação de uma temperatura de anelamento ideal, as reações de PCR preparativas foram realizadas para validar cada conjunto de iniciadores de PCR e para gerar o amplicon de sequenciamento de ILLUMINA™.

[085] Para a PCR preparativa, reações de PCR em 8 pequenas escalas individuais foram realizadas para cada padrão usando as condições descritas acima e os produtos de PCR resultantes foram misturados e o gel purificado em géis a 3,5 % de agarose usando o QIAGEN MINELUTE GEL EXTRACTION/PURIFICATION KIT™ por recomendações do fabricante. As concentrações dos amplicons purificados em gel foram determinadas por NANODROP™ e as amostras de sequenciamento de ILLUMINA™ foram preparadas misturando-se aproximadamente 100 ng de amplicons de PCR de ZFN alvejado e controles do tipo selvagem correspondente. Os iniciadores usados para a geração de amplicon de PCR são mostrados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2

Oligonucleotídeos para amplificação de sítios de ligação de ZFN.

Número de Dedo de Zinco de Evento de Milho DAS-59132	Direção // SEQ ID NO:	Sequência de Iniciador
25686/25687 e 25688/25689	Dianteiro // SEQ ID NO:14	CAGGCAGCGCCACCGAAC
	Reverso // SEQ ID NO:15	CGATCGATCGCGTGCCGT
256892/256893	Dianteiro // SEQ ID NO:16	CTGGCACGGCACGCGATC
	Reverso // SEQ ID NO:17	CGGAGATCCGGCCCCAAC
25710/25711	Dianteiro // SEQ ID NO:18	GACACGGCACACACGGCG
	Reverso // SEQ ID NO:19	TCGGGCATCGGCGACTGA
25712/25713 e 25716/25717	Dianteiro // SEQ ID NO:20	ACTCGGCACAAGGCTCAT
	Reverso // SEQ ID NO:21	CCTGTGCCAATTCTAAAG
9149/9215	Dianteiro // SEQ ID NO:22	GCAGTG CATGTTATGAGC
	Reverso // SEQ ID NO:23	CAGGACATAAATGAACTGAATC

Análise e sequenciamento de ILLUMINA™

[086] Os ZFNs foram projetados para reconhecer, se ligar a e

modificar as sequências de DNA específicas dentro do loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 transgênico. A eficácia pela qual os seis ZFNs clivaram o loco genômico foi ensaiada para determinar que a ZFN clivasse mais eficazmente. O sequenciamento de ILLUMINA™ foi realizado em Cofactor Genomics (St. Louis, MO) e as sequências foram analisadas usando um *script* de análise de sequência. As sequências de baixa qualidade foram filtradas e as sequências restantes foram analisadas de acordo com os identificadores de sequências de DNA únicas. Os identificadores de sequências de DNA únicas foram em seguida alinhados com a sequência de referência e marcados para inserções/deleções (*indels*). Para determinar o nível de atividade de clivagem, a região circundante ao sítio de clivagem de ZFN foi marcada para a presença de variantes de sequência que resultaram dos *indels*. A atividade de clivagem para cada ZFN no estudo foi calculada como o número de sequências com *indels*/1M de sequências de alta qualidade ou como uma porcentagem de sequências de alta qualidade com *indels*. Os níveis de eficácia de clivagem foram determinados normalizando-se o nível de ZFN de atividade de clivagem com a atividade de uma ZFN direcionada para o gene de IPP2-K como descrito na Publicação de Patente dos Estados Unidos nº 2011/0119786.

[087] A ZFN6 de E32 que contém os domínios de ligação de dedo de zinco 25716 e 25717 clivou o loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 transgênico com a maior eficácia. Este ZFN funcionalizado a 3,8 vezes a eficiência do controle IPPK2 nuclease de dedo de zinco. Dados os altos níveis de atividade de clivagem de ZFN6 DE E32, esta ZFN foi selecionada para uso na integração de fragmento de DNA doador no loco genômico por meio de junção final não homóloga.

Tabela 3

Eficácia de clivagem das eZFNs testadas.

Número de ZFN de E32	% de atividade de ZFN de IPPK2
25686/25687	32
25688/25689	108
25712/25713	69
25716/25717	380

EXEMPLO 4: Expressão Transitória de ZFNs de E32 em Protoplastos de Milho para Demonstrar o Alvejamento de NHEJ no Loco E32

[088] Um sistema de teste rápido para alvejamento de gene foi estabelecido para alvejar os locos genômicos endógenos de Evento de Milho DAS-59132 e para otimizar os parâmetros de alvejamento do doador em milho. As rupturas de filamento duplo foram geradas dentro do genoma no Evento de Milho DAS-59132 e reparadas pela junção final não homóloga (NHEJ) ou reparo dependente de homologia (HDR).

Isolamento de protoplasto

[089] As culturas de suspensão embriogênicas de Hi-II de milho foram mantidas em um horário de subcultura de 3,5 dias. Uma solução de 10 mL de 6 % (peso/volume) de celulase estéreis e uma solução de 10 mL de 0,6 % (peso/volume) de soluções de enzima de pectoliase foi pipetada em um tubo cônico de 50 mL. Em seguida, 4 mL em volumes de célula em pacote (PCV) de células de suspensão de Hi-II foram adicionados no tubo de 50 mL contendo a solução de digesto e embrulhados com Parafilm®. Os tubos foram colocados em um oscilador de plataforma em temperatura de cerca de 16 a 18 horas. Em seguida, as células e solução de enzima foram lentamente filtradas através de um coador de célula de 100 µM colocado em um tubo cônico de 50 mL. As células foram em seguida enxaguadas usando um coador de célula de 100 µM pipetando-se 10 mL de meios de W5 através do agitador. As células e solução de enzima foram lentamente filtradas através de um coador de célula de 70 µM. Esta etapa de filtragem foi

seguida por outra etapa de filtração, em que as células e a solução de enzima foram lentamente filtradas através de um coador de célula de 40 μM colocado em um tubo cônico de 50 mL. Usando uma ponta da pipeta de 10 mL, o coador de célula de 40 μM foi enxaguado com 10 mL de meios de W5 para fornecer um volume final de 40 mL e o tubo foi invertido. Muito lentamente, 8 mL de uma solução de coxim de sacarose foram adicionados ao fundo da solução de protoplasto/enzima. Usando uma centrífuga com um rotor de balde de braço oscilante, os tubos foram girados durante 15 minutos a 1.500 rpm. As células de protoplasto foram removidas usando uma ponta da pipeta de perfuração estreita de 5 mL. Estas células (7 a 8 mLs) que foram observadas como uma faixa de protoplasto foram removidas muito lentamente e colocadas em um tubo cônico de 50 mL estéril. Em seguida, 25 mL de meios de W5 foram usados para lavar os tubos. Os meios de lavagem de W5 foram adicionados aos protoplastos e os tubos foram invertidos lentamente e centrifugados durante 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi removido e 10 mL de solução de MMG foram adicionados com inversão lenta do tubo para ressuspender a pélete de protoplasto. A densidade de protoplastos foi determinada usando um hemocítmetro. Quatro PCVs rendem cerca de 30 milhões de protoplastos.

Transformação de protoplasto

[090] As células de protoplasto foram diluídas para 1,6 milhões de protoplastos por mL usando solução de MMG. Os protoplastos foram suavemente ressuspensos lentamente invertendo-se o tubo. Em seguida, 300 μL de protoplastos (cerca de 500 k de protoplastos) foram adicionados a um tubo de 2 mL estéril e os tubos foram invertidos para uniformemente distribuir as células de protoplasto. O DNA de plasmídeo em uma concentração de 40 a 80 μg em tempão de TE foi adicionado ao protoplastos. As condições experimentais são descritas na tabela 4. Os tubos foram lentamente laminados para suspender o

DNA com os protoplastos e os tubos foram incubados durante 5 a 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 300 μ L de uma solução de PEG foram adicionados à solução de protoplasto/DNA. Uma vez que toda a solução de PEG foi adicionada, a solução de PEG foi misturada com a solução de protoplasto suavemente invertendo-se o tubo. O coquetel foi incubado em temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos com inversão periódica do(s) tubo(s). Após a incubação, 1 mL de solução de W5 foi lentamente adicionado aos tubos e os tubos foram suavemente invertidos. Finalmente, a solução foi centrifugada a 1.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido a fim de não perturbar a pélete de célula. Um mililitro de solução de lavagem/incubação foi adicionado. Os tubos foram suavemente invertidos para ressuspender a pélete celular. Os tubos foram revestidos com folha de alumínio para eliminar qualquer exposição à luz, e foram dispostos em uma prateleira do seu lado para incubar durante a noite. As células foram colhidas 24 horas após a transformação para análise molecular.

Tabela 4

Grupos de tratamento para transformação de protoplasto.

Grupos de Tratamento	pDAB100651 do DNA Doador (µg)	PDAB105906 de E32-ZFN6 (µg)	Carga de pUC19 (µg)	Carga de DNA de Esperma de Salmão (µg)	DNA Total (µg)
Doador de E32 + Nenhum controle de enzima (carga-1)	pDAB100651 (40 µg)	N/A (0 µg)	pUC19 (40 µg)	N/A (0 µg)	80
Doador de E32 sozinho + Nenhum controle de enzima (carga-2)	pDAB100651 (40 µg)	N/A (0 µg)	N/A (0 µg)	ssDNA (40 µg)	80
Doador de E32 sozinho controle (nenhuma carga)	pDAB100651 (40 µg)	N/A (0 µg)	N/A (0 µg)	N/A (0 µg)	40
E32-ZFN6 sozinho controle (nenhum doador) carga1	N/A (0 µg)	pDAB105906 (4 µg)	pUC19 (76 µg)	N/A (0 µg)	80
E32-ZFN6 sozinho controle (nenhum doador) carga2	N/A (0 µg)	pDAB105906 (4 µg)	N/A (0 µg)	ssDNA (76 µg)	80
E32-ZFN6 wt FokI sozinho controle (nenhum doador) Nenhuma carga	N/A (0 µg)	pDAB105906 (40 µg)	N/A (0 µg)	N/A (0 µg)	40
E32-ZFN6 wt FokI+ Doador de E32 (1:10) carga1	pDAB100651 (40 µg)	pDAB105906 (4 µg)	pUC19 (36 µg)	N/A (0 µg)	80
E32-ZFN6 wt FokI+ Doador de E32 (1:10) carga2	pDAB100651 (40 µg)	pDAB105906 (4 µg)	N/A (0 µg)	ssDNA (36 µg)	80

Validação de Sequência de alvejamento usando NGS

[091] A atividade de clivagem de ZFN em protoplastos de milho foi determinada usando o método de Sequenciamento de Geração Seguinte descrito no EXEMPLO 3. Os fragmentos amplificados de PCR foram marcados para a presença de variantes em sequência resultando de *indels*. A frequência relativa de *indels* de cada tratamento de ZFN6 de E32 clivou o loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 transgênico em cerca de 1,5 % das moléculas de DNA nos amplicons.

Demonstração de alvejamento usando PCR *In-out*

[092] O alvejamento de um cassete de doador contendo gene AAD-1 no loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 transgênico nas suspensões de célula transgênica de milho de Hi-II por meio de NHEJ foi confirmado por meio de reações de PCR *in-out*. As reações de PCR *in-out* amplificaram os fragmentos contendo a junção do doador de gene AAD-1 e o loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 transgênico. O amplicon resultante foi submetido a uma segunda reação de PCR, em que os iniciadores foram projetados para se ligarem internamente dentro do primeiro amplicon. A combinação de duas reações de PCR independentes resultou na remoção de amplificações antecedentes que podem ser falso-positivas.

[093] Os resultados PCR *in-out* dos experimentos de transformação de protoplasto demonstraram que o loco genômico de Evento de Milho DAS-59132 transgênico pode ser reproduzivelmente alvejado com um doador de plasmídeo de gene AAD-1 5,3 kb e a nuclease de dedo de zinco E32-ZFN6 em uma relação de 1:10 µg de Alvejamento de DNA por meio de um método de NHEJ foi evidenciada pela inserção do cassete de doador de gene AAD-1 em ambas as orientações. A sequência dos amplicons de PCR *in-out* mostrou três exemplos de integração perfeita do DNA doador.

EXEMPLO 5: Transformação Estável Mediada por WHISKERS™ de ZFN e Doador para Integração Alvejada por meio de NHEJ em Culturas de Hi-II de Milho

[094] Os eventos transgênicos foram alvejados no loco genômico endógeno de Evento de Milho DAS-59132. Os constructos como descrito no Exemplo 1 incluem a sequência doadora (pDAB100655) e o ZFN 6 de Evento 32 (ZFN6 DE E32; pDAB105906).

[095] As células do calo do milho, consistindo em 12 mL de volume globular (PCV) de uma linhagem celular de Hi-II previamente crio-preservada, mais 28 mL de meio condicionado foram subcultivadas em 80 mL de meio líquido de GN6 (meio de N6 (Chu, e outro, (1975) *Sci Sin.* 18:659–668), 2,0 mg/L de 2, 4-D, 30 g/L de sacarose, pH 5,8) em um frasco de Erlenmeyer de 500 mL, e colocados em um agitador a 125 rpm a 28°C. Esta etapa foi repetida duas vezes usando a mesma linhagem celular, de tal forma que um total de 36 mL PCV foi distribuído através de três frascos. Após 24 horas, os meios líquidos de GN6 foram removidos e substituídos com 72 mL de meio osmótico de GN6 S/M (N6 de Meio, 2,0 mg/L 2,4-D, 30 g/L de sacarose, 45,5 g/L de sorbitol, 45,5 g/L de manitol, 100 mg/L de mio-inositol, pH 6,0). O frasco foi incubado no escuro durante 30 a 35 minutos a 28°C com agitação moderada (125 rpm). Durante o período de incubação, uma suspensão de 50 mg/mL de WHISKERS™ de carboneto de silício (Advanced Composite Materials, LLC, Greer, SC) foi preparada adicionando-se 8,1 mL de meio líquido de GN6 S/M a 405 mg de WHISKERS™ de carboneto de silício, estéril.

[096] Após a incubação em meio osmótico de GN6 S/M, os teores de cada frasco foram colocados em uma garrafa de centrifuga de 250 mL. Após todas as células no frasco assentarem no fundo, o volume de teor em excesso de aproximadamente 14 mL de GN6 S/M líquido foi retirado e coletado em um frasco de 1 L estéril para uso futuro. A suspensão pré-umedecida de WHISKERS™ foi misturada em

velocidade máxima em um vórtice durante 60 segundos, e em seguida adicionada à garrafa de centrífuga.

[097] Neste exemplo, 159 µg de pDAB100655 (sequência doadora) e 11 µg de DNA de plasmídeo pDAB10506 (ZFN) foram adicionados a cada garrafa. Uma vez que o DNA de plasmídeo foi adicionado, a garrafa foi imediatamente colocada em um misturador de tinta comercial RED DEVIL 5400™ modificado (Red Devil Equipment Co., Plymouth, MN), e agitada durante 10 segundos. Após a agitação, o coquetel de células, meios, WHISKERS™ e DNA de plasmídeo foram adicionados aos teores de um frasco de 1 L juntamente com 125 mL de meio líquido de GN6 fresco para reduzir o osmótico. As células foram deixadas recuperar em um agitador fixado a 125 rpm durante 2 horas. Cerca de 6 mL de suspensão dispersa foram filtrados no papel de filtro Whatman #4 (5,5 cm) usando uma unidade de coletor de célula de vidro conectada a uma linhagem de vácuo doméstica de tal forma que 60 filtros foram obtidos por garrafa. Os filtros foram colocados sobre placas de 60 x 20 mm de meio sólido de GN6 (mesmo como meio líquido de GN6, exceto com 2,5 g/L de glufosinato).

Identificação e isolamento de eventos alvejados putativos

[098] Uma semana após liberação de DNA, os papéis de filtro foram transferidas para 60 x 20 mm de placas de meio de seleção de GN6 (1H) (Meio de N6, 2,0 mg/L 2, 4-D, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8) contendo um agente seletivo. Estas placas de seleção foram incubadas a 28° C durante uma semana no escuro. Após 1 semana de seleção no escuro, o tecido foi incrustado no meio fresco raspando ½ das células de cada placa em um tubo contendo 3,0 mL de meio de GN6 agarose mantidos a 37 a 38° C (meio de N6, 2,0 mg/L 2, 4-D, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 7 g/L de SEAPLAQUE® agarose, pH 5,8, autoclavados durante 10 minutos a 121° C).

[099] A mistura de agarose/tecido foi desintegrada com uma espátula, e em seguida 3 mL de mistura de agarose/tecido foram uniformemente despejados sobre a superfície de um prato de PETRI™ de 100 x 25 mm contendo meio de GN6 (1H). O processo foi repetido para as duas metades de cada prato. Uma vez que o tecido foi incrustado, as placas foram incubadas a 28°C sob condições de escuro durante até 10 semanas. Os isolados putativamente transformados que cresceram sob estas condições de seleção foram removidos das placas incrustadas e transferidos para meio de seleção fresco em placas de 60 x 20 mm. Se o crescimento sustentado era evidente após aproximadamente 2 semanas, um evento foi considerado ser resistente ao herbicida aplicado (agente seletivo) e uma alíquota de células foi subsequentemente colhida para análise do genótipo. Neste exemplo, 24 eventos foram reconhecidos a partir das 6 garrafas tratadas. Estes eventos foram um avanço para análise molecular para confirmar a integração.

Análise molecular de alvejamento de NHEJ no loco E32

[0100] Os 24 eventos que foram recuperados a partir da transformação mediada por WHISKERS™, como descrito acima, foram analisados usando várias ferramentas moleculares diferentes. Como resultado da análise, os eventos que continham uma cópia do transgene AAD-1 integrados dentro do loco genômico de E32 foram identificados. Os 24 vários eventos foram confirmados conter uma cópia do transgene AAD-1 e em seguida foi determinado se houve rompimento do sítio de E32 por *indels* ou por inserção de cassete de AAD-1. Os eventos que foram positivos para a presença do gene AAD-1 e um sítio de ZFN rompido foram também caracterizados pela presença dos fragmentos de junção alvo e doadores esperados (por PCR *In-out*), e pelos fragmentos de peso molecular esperados que corresponderam com os tamanhos de faixa em *Southern blot* que indicaram uma inserção alvejada da região de DNA doador dentro do loco genômico de E33. Estes

ensaios confirmaram aqueles eventos contendo uma cópia do transgene de AAD-1 integrada dentro do loco genômico de E32 por meio de um mecanismo de NHEJ.

Extração de DNA

[0101] O DNA foi extraído do tecido de calo de milho liofilizado usando um *kit* de isolamento de QIAGEN BIOSPRINT 96™ DNA por recomendações do fabricante. Um programa pré-definido foi usado para a extração por automatização e o DNA foi eluído em 200 µL de 1:1 de Tampão de TE/água destilada. Dois microlitros (2 µL) de cada amostra foram quantificados em THERMOSCIENTIFIC NANODROP 8000™ e as amostras foram normalizadas a 100 ng/µL usando QIAGEN BIOROBOT 3000™. O DNA normalizado foi armazenado a 4°C até outra análise.

Avaliação de número de cópia

[0102] A determinação do número de cópia de transgene por um ensaio de sonda de hidrólise, análogo a um ensaio de TAQMAN®, foi realizada por PCR em tempo real usando o sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Os ensaios foram projetados para AAD-1 e o gene de referência interno, Invertase, usando LIGHTCYCLER® Probe Design *Software* 2.0. Para amplificação, a LIGHTCYCLER®480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) foi preparada em concentração final de 1X em uma reação múltipla de 10 µL em volume contendo 0,4 µM de cada iniciador e 0,2 µM de cada sonda (Tabela 5). Uma reação de amplificação de duas etapas foi realizada com uma extensão a 60°C durante 40 segundos com aquisição de fluorescência. A análise dos dados de número de cópia de PCR em tempo real foi realizada usando LIGHTCYCLER® *software* versão 1.5 usando o módulo Relative Quant e é com base no método $\Delta\Delta Ct$. Para isto, uma amostra de gDNA de um calibrador de cópia única e uma verificação de duas cópias conhecida foram incluí-

das em cada execução.

Tabela 5

Sequências de Iniciador/Sonda para ensaio de sonda de hidrólise de AAD-1 e referência interna.

Nome do Iniciador	Sequência	Deteção
GAAD1F	SEQ ID NO:24 ; TGTTCCGGTTCCTCTACCAA	--
GAAD1R	SEQ ID NO:25 ; CAACATCCATCACCTTGACTGA	--
GAAD1R	SEQ ID NO:26; CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA	FAM
IVF-Taq	SEQ ID NO:27; TGGCGGACGACGACTTGT	--
IVR-Taq	SEQ ID NO:28 ; AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	--
IV-Probe	SEQ ID NO:29 ; CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC	HEX

Ensaio de ruptura de loco genômico de Evento de Milho DAS-59132

[0103] Um ensaio de ruptura de loco genômico para Evento de Milho DAS-59132 foi realizado por PCR em tempo real usando o sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Os ensaios foram projetados para monitorar a especificidade para qual ZFN6 de E32 (25716/25717) ligou-se a e clivou as sequências genômicas do loco E32 e do gene invertase de referência interna usando o LIGHTCYCLER® Probe Design *Software* 2.0. Para amplificação, a LIGHTCYCLER®480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) foi preparada em concentração final de 1X em uma reação múltipla de 10 µL em volume contendo 0,4 µM de cada iniciador e 0,2 µM de cada sonda (Tabela 6). Uma reação de amplificação de duas etapas foi realizada com uma extensão a 55°C durante 30 segundos com aquisição de fluorescência. A análise para o ensaio de rompimento foi realizada usando alvo para relação de referência (Figura 5). Quatro dos oito eventos foram identificados como contendo um transgene de AAD-1 integrado no loco genômico de Evento de Milho DAS-59132. Os seguintes eventos, consistindo em: Evento 100655/105906[1]-001, Evento 100655/105906[5]-013, Evento 100655/105906[5]-015, e Evento 100655/105906[3]-018, foram avançados para outra análise molecular

para confirmar a integração do transgene de AAD-1 dentro do loco genômico de Evento de Milho DAS-59132.

qPCR *in-out* específica de loco de Evento32

[0104] A inserção do DNA doador AAD-1 dentro do loco genômico de E32 por meio do NHEJ pode ocorrer em uma das duas orientações. A integração do transgene de AAD-1 e a orientação para a inserção foram confirmadas com um ensaio de PCR *in-out*. O ensaio de PCR *in-out* utiliza um iniciador "*out*" que foi projetado para se ligar ao loco genômico de E32; um iniciador "*in*" foi projetado para se ligar à sequência doadora de AAD-1. As reações de amplificação usando estes iniciadores apenas unificam um gene doador que é inserido no sítio alvo. Os amplicons de PCR resultantes representam os fragmentos de junção do sítio alvo de E32 e as sequências de DNA doador nas extremidades 5' ou 3' da inserção. Os controles negativos e positivos foram incluídos no ensaio. Os dois plasmídeos de controle positivo, pDAB100664 e pDAB100665, foram construídos para simular a inserção de doador no loco genômico de E32 em cada das duas orientações diferentes.

[0105] Para o PCR *in-out*, um corante de intercalação de DNA, SYTO-13®, foi usado na mistura de PCR a fim de detectar a amplificação em tempo real em um termociclizador com capacidade de detecção de fluorescência. Além disso, uma análise de temperatura de fusão (T_m) foi ligada a um programa de PCR regular de modo que os produtos pudessem ser analisados quanto aos seus perfis de T_m . Qualquer similaridade entre os perfis de T_m de uma amostra desconhecida e a amostra de controle positivo indicaria que a amostra desconhecida tem o mesmo produto amplificado como aquele do controle positivo. As reações de PCR foram conduzidas usando 10 ng de DNA genômico padrão, 0,2 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de iniciadores dianteiros e reversos, 4 μ M SYTO-13® e 0,15 μ L de Ex Taq HS. As reações foram

contempladas em duas etapas: a primeira etapa consistia em um ciclo a 94°C (2 minutos) e 35 ciclos a 98°C (12 segundos), 66°C (30 segundos) e 68°C (1,3 minutos); a segunda etapa foi um programa de Tm abrangendo 60 a 95°C seguidos por 65°C (30 segundos) e 72°C (10 minutos) (Tabela 6). Os amplicons foram colocados em sequência para confirmar que o gene AAD-1 tinha se integrado dentro do loco genômico de E32.

[0106] Os resultados dos amplicons de PCR *in-out*, em tempo real, foram visualizados usando o *software* ABI. Estes resultados foram também confirmados usando um ensaio de desvio em gel, em que os amplicons foram executados em um gel de TAE a 1,2%. Os tamanhos de amplicon esperados foram de aproximadamente 1,8 kb para a orientação como representado em pDAB100664 e cerca de 2 kb para a orientação representada em pDAB100665. Os resultados de ensaio de desvio em gel confirmaram os dados de PCR *in-out*, em tempo real.

[0107] Os dados de ruptura de local e PCR *in-out* sugeriram que uma cópia do transgene de AAD-1 tinham se integrado por meio de NHEJ no loco E32 nos mesmos eventos de milho reconhecidos por seleção em 2,4-D.

Tabela 6

Iniciadores para PCR *In-out* para detectar o alvejamento mediado por NHEJ.

Nome do Iniciador	Sequência	Tamanho / controle de Amplicon Esperado
E32-3R2 NJ-AAD1-Pri2	Iniciador Dianteiro SEQ ID NO:30 GCC CTT ACA GTT CAT GGG CG Iniciador Reverso SEQ ID NO:31 GAC CAA GTC CTT GTC TGG GAC A	1,8 kb de pDAB100664
E32-5F1 NJ-AAD1-Pri2	Iniciador Dianteiro SEQ ID NO:32 ACA AAC ACG TCC TCC AAG GCT Iniciador Reverso SEQ ID NO:33 GAC CAA GTC CTT GTC TGG GAC A	2,0 kb de pDAB100665

[0108] Análise de *Southern blot*

[0108] Os eventos de calo de milho identificados acima como putativamente alvejado foram também analisados usando um ensaio de *Southern blot* para confirmar que o transgene de AAD-1 tinha se integrado por meio de NHEJ no loco E32. Os experimentos de análise de *Southern blot* geraram dados que demonstraram a integração e integridade do transgene de AAD-1 dentro do genoma de milho.

Extração de DNA

[0109] O DNA genômico foi extraído do tecido de calo colhido de cada evento individual. Inicialmente, as amostras de tecido foram coletadas em tubos de 2 mL e liofilizadas durante 2 dias. A maceração de tecido foi realizada com um KLECO TISSUE PULVERIZER™ e contas de tugstênio (Kleco, Visalia, CA). Após a maceração de tecido o DNA genômico foi isolado usando a DNEASY PLANT MINI KIT™ (Qiagen, Germantown, MD) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

[0110] O DNA genômico (gDNA) foi quantificado usando o QUANT-IT PICO GREEN DNA ASSAY KIT™ (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). gDNA quantificado foi ajustado para 4 µg para a análise de *Southern blot*. As amostras de DNA foram em seguida digeridas usando a enzima de restrição de NcoI (New England BioLabs, Ipswich, MA) durante a noite a 37°C e purificadas usando QUICK-PRECIP™ (Edge BioSystem, Gaithersburg, MD) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA foi ressuspense em corante de 1X e eletroforesado durante 5 horas em um SEAKEM LE AGAROSE™ a 0,8 % (Lonza, Rockland, ME) gel. O gel foi desnaturado, neutralizado, e em seguida transferido para uma membrana carregada de náilon (Millipore, Bedford, MA) durante a noite e o DNA foi reticulado com a membrana usando um UV STRATA LINKER 1800™ (Stratagene, La Jolla, CA), e as manchas foram pré-hibridizadas com 20 mL de PERFECTHYB PLUS™ (Sigma, St. Louis, MO). A sonda de 226 bp SEQ ID

NO:34

(GTGCATTCCGGATTACTGTTTAGTCGAGTCATATTTAAGGAATTCATTGTAAATGTTCT
AACCTAACCTAAGTATTAGGCAGCTATGGCTGATATGGATCTGATTGGACTTGATTIA
TCCATGATAAGTTTAAGAGCAACTCAAAGAGGTTAGGTATATATGGTTTTGTAAAGGT
AAATTTAGTTAATATTAGAAAAAAAAAAGTGTATCCAATAGGCTCTATAAACA)

foi rotulada usando PRIME-IT RMT RANDOM™ (Stratagene, La Jolla, CA) de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante e purificada usando PROBE QUANT G-50 MICRO COLUMNS™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) pelo protocolo sugerido pelo fabricante. Aproximadamente, 20×10^6 cpm da sonda rotulada foram adicionados às manchas e incubados durante a noite. As manchas foram lavadas duas vezes durante 15 minutos por lavagem e colocadas em uma tela de imagem de fósforo durante 24 horas e analisadas por um STORM 860 SCANNER™ (Molecular Dynamics).

[0111] Os resultados de análise de *Southern blot* mostraram que o DNA a partir de alguns eventos tinha contatos de NcoI do tamanho esperado (2,9 e 5,5 kb) a partir da integração do DNA doador por meio de NHEJ no loco E32.

[0112] O tecido de milho transformado foi gerado em plantas de milho férteis portando a resistência de fenótipo de geração verdadeira aos herbicidas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético conferidos pelo gene de AAD-1 introduzido pelo DNA doador.

EXEMPLO 6: Evento 32 de Alvejamento por meio de Reparo Dirigido por Homologia em Hi-II de Zea mays c.v.

Vetores de plasmídeo

[0113] Os vetores de plasmídeo contendo as constructos de expressão de ZFN foram construídos como descrito no Exemplo 2. A ZFN expressa na constructo de plasmídeo, pDAB105906 (Figura 2), contém "Fok-Mono" que é uma FokI endonuclease do tipo selvagem. A ZFN expressa na constructo de plasmídeo, pDAB111809 (Figura 3), contém "Fok1-ELD" que é uma FokI endonuclease modificada. Uma

Fok1 endonuclease modificada contém alterações como descrito em Doyon Y., Vo T., Mendel M., Greenberg S., Wang J., Xia D., Miller J., Urnov F., Gregory P., e Holmes M. (2010) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architecture. *Nature Methods*, 8(1); 74-79.

[0114] Um constructo de doador, pDAB107855 (Figura 15), foi projetada e construída para se integrar no DNA genômico clivado por ZFN do loco genômico de DAS-59132. Este cassete de expressão de gene único é compreendido do promotor de OsAct1, a sequência de codificação de *fosfinotricina acetil transferase* (PAT) :: e o ZmLip 3' UTR. Além disso, o plasmídeo do doador foi projetado com sequências de 1 kb (ramificações de homologia) em cada extremidade do gene PAT alvo que eram homólogas às sequências em cada extremidade do sítio de corte de ZFN no loco genômico de DAS-59132. As ramificações de homologia serviram como o substrato que a maquinaria de recombinação homóloga usou para inserir o transgene no sítio de corte de ZFN genômica. Os vários elementos de gene foram agrupados em um plasmídeo baseado em pUC de número de cópia elevado.

Transformação de planta

[0115] As transformações de WHISKERS™ foram feitas como descrito no EXEMPLO 5 usando DNA de plasmídeo de pDAB107855 (sequência doadora) e pDAB105906 (ZFN).

Análise Molecular para Confirmar a Integração Alvejada de um Cassete de Gene PAT no loco E32 de Hi-II

Extração de DNA

[0116] As extrações de DNA foram feitas como descrito no EXEMPLO 5.

Ensaio de ruptura de local alvejado

[0117] A transformação mediada por WHISKERS™ de células de calo de Hi-II com o DAS-59132-ZFN e o plasmídeo do doador resultou

em inserções de transgene alvejadas e randômicas. Para distinguir os eventos de inserção randômica das populações de evento alvejadas, todos os 854 eventos gerados foram inicialmente analisados usando um ensaio de ruptura de local (feito como descrito no EXEMPLO 5 usando iniciadores na TABELA 7). Este ensaio determinou se o sítio de ligação de ZFN dentro do local permanece intacto ou se foi rompido através da inserção de doador ou clivagem de ZFN. A indicação de uma ruptura dentro dos locos genômicos é a evidência inicial de que o ZFN clivou o local alvo de DAS-59132 endógeno e indica inserção alvejada da molécula de DNA doador. Os iniciadores foram projetados para amplificar a região alvo endógena que contém os sítios de reconhecimento de ZFN, e as amostras foram estabelecidas para serem analisadas por qPCR. A amplificação da região intacta, indicadora de um evento não alvejado, resultou em um amplicon de 140 pares de base medido como um sinal de qPCR detectável. A integração alvejada com sucesso da molécula doadora resulta no rompimento do sinal de qPCR detectável e é mostrada como um sinal global inferior em comparação ao controle.

Tabela 7

Iniciador de Oligonucleotídeo e Sequências de Sonda para Ensaio de ruptura de Local Alvejado.

Nome do Iniciador	SEQ ID NO:	Sequência	Deteção
MAS604	SEQ ID NO:35	ACACGGCACACACGGCGACATTCA	---
MAS606	SEQ ID NO:36	AGGGCAGTGGCCAGTGTTCTGTG	---
UPL 69	--	Sequência de Roche	FAM
IVF-Taq	SEQ ID NO:37	TGGCGGACGACGACTTGT	---
IVR-Taq	SEQ ID NO:38	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	---
IV-Probe	SEQ ID NO:39	CGAGCAGACCGCCGTGTAATTCTACC	HEX

[0118] Os 854 eventos gerados a partir da transformação de precisão foram analisados com o ensaio de ruptura, e marcados como

rompidos com base em uma queda significativa no alvo para sinal de referência. Os resultados indicaram que 63 dos 854 eventos ensaiados tinham um sinal rompido no local alvejado, indicador de inserção de gene alvejado ou *indels* no sítio.

Ensaio de PCR *in-out* de local alvejado de

[0119] A presença de uma inserção foi também confirmada usando PCR *in-out* como descrito no EXEMPLO 5 e usando os iniciadores na Tabela 8. As amostras positivas identificadas no sistema em tempo real foram também confirmadas usando um ensaio de desvio em gel padrão.

[0120] Tabela 8

[0120] Sequências de Iniciador e Sonda para Ensaio de *In-out* de Loco de DAS-59132.

	Nome de Iniciador	SEQ ID NO:	Sequência de Iniciador
Sequência de Junção 5'	E32-5F3	SEQ ID NO:40	GAAGGCCAAAACGAATATAAGTGCATTTCGG
	E32-OLP-R1	SEQ ID NO:41	TCGTGGATAGCACTTTGGGCT
Sequência Junção de 3'	E32-OLP-F3	SEQ ID NO:42	TCTACAGTGAACCTTTAGGACAGAGCCA
	E32-3R2	SEQ ID NO:30	GCCCTTACAGTTCATGGGCG

[0121] Os resultados do ensaio de ruptura e o ensaio de PCR *in-out* de local alvejado foram também confirmados por meio de *Southern blotting* e sequenciamento (padrão de Sequenciamento de Geração Seguinte).

[0122] Neste exemplo, 63 eventos fora de um total de 854 amostras submetidas mostraram rompimento do loco E32. Destes, 8 eventos alvos foram identificados por PCR *in-out* e análise de *Southern*.

[0123] O tecido de milho transformado foi regenerado em plantas de milho férteis portando o fenótipo de geração verdadeira, resistência

a glufosinato e L-fosfinothricina, herbicidas, do DNA doador.

EXEMPLO 7: Liberação Mediada por Agrobactéria de Vetores de plasmídeo para Rompimento de Loco de Evento 32 em B104 de *Zea mays* c.v.

Transformação

[0124] *Zea mays* c.v. B104 foi transformado com constructos binários pDAB108688 (vetor de controle, Figura 6) e pDAB108690 (vetor de alvejamento, Figura 7) usando o sistema de transformação suplementar (Patente dos estados Unidos 5.591.616). Como tal, a *Agrobacterium* foi usada para liberação dos ZFNs ao loco genômico de E32. Os calos de milho transgênico foram obtidos e analisados por meio de ensaios de confirmação molecular para determinar se ou não o loco genômico de E32 de V104 de *Zea mays* c.v. foi rompido. Os resultados dos ensaios confirmaram que a *Agrobacterium* poderia ser usada para liberar os ZFNs para clivar e romper o loco genômico de E32.

Vetores binários

[0125] Um constructo binário, pDAB108690 (vetor de alvejamento, Figura 7), foi projetado e construído para conter um cassete de expressão de doador e um cassete de expressão de gene de ZFN. Este cassete de expressão de gene doador foi compreendido do promotor de gene de Ubiquitina 1 de *Zea mays* (promotor de Zm Ubi1), a sequência de codificação de AAD-1 e foi terminada pela região não transladada lipase 3' de *Zea mays* (ZmLip 3'UTR). Além disso, o plasmídeo do doador foi projetado com sequência de 1 kb (braços de homologia) em cada extremidade do gene AAD-1 que é homóloga à sequência em cada extremidade do sítio de corte de ZFN no loco genômico de E32 para facilitar a inserção de doador por HDR. O cassete de expressão de gene de ZFN foi compreendido do promotor de gene de Actina1 de arroz (OsAct1 promoter), as sequências de codificação de gene 25716 e 25717 ZFN e o ZmPer5 3' UTR.

[0126] Além disso, um segundo constructo binário de controle, pDAB108688 (vetor de controle, Figura 6), foi projetado e construído para conter um cassete de expressão de gene, o mesmo gene AAD-1. Além disso, o plasmídeo doador foi projetado com sequências 1 kb (ramificações de homologia) em cada extremidade do gene *aad-1* alvo que é homóloga à sequência em cada extremidade do sítio de corte de ZFN no loco genômico de E32.

Transformações de B104 de *Zea mays* c.v.

[0127] Os constructos foram transferidos em *Agrobacterium* e usados para transformar B104 de *Zea mays* c.v. O procedimento de transformação que foi utilizado é descrito na Publicação de Patente dos estados Unidos nº 2013/0157369. Após conclusão da transformação, os tecidos do calo de milho isolados foram selecionados para e obtidos de meios contendo o agente selecionável de herbicida. A Tabela 9 mostra a frequência de transformação nos experimentos. Os eventos resultantes foram analisados por meio de análise molecular para confirmar a clivagem mediada por ZFN do loco E32 de B104 de *Zea mays* c.v. após a liberação de ZFN e doador por meio de transformação medida por *Agrobacterium*.

Tabela 9

Sumário de eventos de transformação produzidos usando pDAB108688 (vetor de controle) e pDAB108690 (vetor de alvejamento).

Constructo	Número de embriões imaturos transformados	Eventos putativos produzidos	Frequência de transformação (%)
pDAB108688 (vetor de controle)	930	355	38.17
pDAB108690 (vetor de alvejamento)	4789	1002	20.92

Isolamento de DNA genômico para PCR de tecido de calo

[0128] O DNA genômico foi isolado como descrito no EXEMPLO 5.

Determinação do número de cópia

[0129] A detecção de transgene por ensaio de sonda de hidrólise, análogo ao ensaio de TaqMan®, foi realizada por PCR em tempo real usando o sistema de LightCycler®480 (Roche Applied Science). Os ensaios foram projetados para seleção de AAD-1 e ruptura de ZFN e foram multiplicados com ensaios de referência interna (Invertase) para assegurar que a quantidade apropriada de gDNA estivesse presente em cada ensaio. Para amplificação, LightCycler®480 Probes Master mix™ (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) foi preparada em concentração final de 1X em uma reação múltipla de 10 µL em volume contendo 0,4 µM de cada iniciador e 0,2 µM de cada sonda (Tabela 10). Uma reação de amplificação de duas etapas foi realizada com uma extensão a 60°C durante 40 segundos (para a reação de AAD1) ou 60°C durante 30 segundos (para a reação de ruptura de ZFN) e com aquisição de fluorescência.

[0130] Os escores de Cp, o ponto em que o sinal de fluorescência atravessa o limiar antecedente usando o algoritmo de pontos de ajuste (Light Cycler® *software* versão 1.5) e o módulo Relative Quant (com base no método $\Delta\Delta Ct$), foram usados para realizar a análise de dados de PCR em tempo real.

[0131] O ensaio de qPCR de ruptura de ZFN determina se o sítio alvo de ZFN está intacto ou foi modificado durante o experimento (por inserção de doador ou por NHEJ). Este ensaio usou a sonda Roche UPL com iniciadores projetados para se anelar fora do sítio de corte do ZFN e da região de hibridização de sonda (Figura 8). Se os eventos são rompidos em ambos os alelos, o alvo para relação de referência é reduzido em comparação com os controles. A análise de eventos e controles não alvejados que não são rompidos mostrou um alvo para relação de referência na faixa de 0,4 a 0,6; os eventos rompidos mostraram um alvo para relação de referência na faixa de 0,2 a 0,35 (Figura 9).

[0132] Estes dados demonstraram que o loco E32 pode ser clivado por introdução do ZFN por meio da transformação mediada por *Agrobacterium*.

Tabela 10

Iniciadores e sondas para qPCR.

Nome	SEQ ID NO:	Sequência Oligo	Sonda (Flourofóro /supressor)
MAS604	SEQ ID NO:53	ACACGGCACACACGGCGACATTCA	---
MAS606	SEQ ID NO:54	AGGGCAGTGGCCAGTGTTCTGTG	---
UPL69	---	Veja Roche	Veja Roche
IVF-Taq	SEQ ID NO:55	TGGCGGACGACGACTTGT	---
IVR-Taq	SEQ ID NO:56	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	---
IV-Probe	SEQ ID NO:57	CGAGCAGACCGCCGTGTACTIONTCTACC	HEX/BHQ
GAAD1F	SEQ ID NO:58	TGTTCCGGTCCCTCTACCAA	---
GAAD1R	SEQ ID NO:59	CAACATCCATCACCTTGACTGA	---
GAAD1P	SEQ ID NO:60	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA	FAM

EXEMPLO 8: Alvejamento de Loco de Evento 32 por Reparo Direcionado por Homologia em B104 em Zea mays c.v.

Vetores

[0133] Os vetores de plasmídeo para expressão de ZFNs foram descritos no EXEMPLO 2.

[0134] Um constructo de doador, pDAB104179 (Figura 10, SEQ ID NO:61), designado para se integrar no DNA genômico clivado por ZFN do loco genômico de E32 foi um cassete de expressão de gene único compreendido do promotor de *OsAct1*, da sequência de codificação de PAT e do *ZmLip* 3' UTR. Além disso, o plasmídeo do doador foi projetado com sequência de 1 kb (braços de homologia) em cada extremidade do gene PAT alvo que é idêntica à sequência em cada extremidade do sítio de corte do ZFN no loco genômico de E32 para facilitar a integração da região DNA doador.

Transformação em B104 usando bombardeiro de partícula

[0135] As orelhas do c.v. B104 de *Zea mays* de linhagem congêni-

ta foram autopolinizadas e colhidas quando os embriões imaturos estavam com aproximadamente 1,8 a 2,2 mm em comprimento. As orelhas descascadas por De foram transportadas para o laboratório para esterilização. A extremidade do cabo de bisturi de aço inoxidável #4 (faltando uma lâmina) foi colocada na porção distal de cada orelha. As orelhas foram esfregadas com uma escova de unha usando detergente líquido (Liqui-Nox®, ALCONOX, Inc.) e esterilizadas na superfície por imersão em 20 % de alvejante comercial (Ultra Clorox® Germicidal Bleach, 6,15% de hipocloreto de sódio) durante 20 minutos, em seguida enxaguadas com água desionizada estéril 3 vezes dentro de um capuz de fluxo laminar. Os embriões zigóticos imaturos foram assepticamente excisados de cada orelha e colocados em um tubo Eppendorf™ contendo, aproximadamente, 2,0 mL de ‘meio de LS-inf’ (sais de LS, vitaminas N6, 68,5 g/L de sacarose, 36 g/L de D-glicose, 700 mg/L L-prolina e 1,5 mg/L de 2,4-D). Os teores do tubo foram despejados em placas de ‘meio restante’ (sais e vitaminas de MS, 30 g/L de sacarose, 700 mg/L L-prolina, 15 mg/L de nitrato de prata, 500 mg/L de MES, 100 mg/L de hidrolisado de caseína, 100 mg/L de mio-inositol e 3,3 mg/L de dicamba ajustados para o pH 5,8 e solidificados com 2,3 g/L de Gelzan™), líquido em excesso foi removido, e os embriões foram orientados com o escutelo virado para cima. As placas foram colocadas a 28°C com 24 horas de iluminação contínua a 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ durante 3 dias.

[0136] Quatro horas antes do bombardeio, 30 embriões foram dispostos no centro de uma placa de Petri de ‘meio de osmólise’ (‘meio restante com a adição de 45,5 g/L de sorbitol e 45,5 g/L de manitol) dentro de uma área de 2,5 cm de diâmetro com o escutelo virado para cima. Os embriões foram incubados neste meio durante 4 horas a 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a 28°C antes do bombardeio.

[0137] Para preparar micropartículas de ouro para bombardeio, 15

mg de 0,6 de mícron de ouro (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos da América) foram pesados em um tubo de microcentrífuga siliconizado e 500 µL de etanol frio (100 %) foram adicionados. O tubo foi sonificado em um banho de água ultrassônico durante 15 segundos, deixado agitar em temperatura ambiente durante 30 minutos, e em seguida centrifugado durante 60 segundos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi removido, e a água estéril, a 1 mL fria foi adicionada. O tubo foi turbilhonado no dedo, deixado assentar durante 3 a 5 minutos, e centrifugado durante 60 segundos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi removido, e a lavagem de água foi repetida mais duas vezes. Após a segunda lavagem de água, o ouro foi ressuspenso em 500 µL de água fria, sonificado durante 15 segundos, e colocado em alíquota de 25 µL uma vez em 10 tubos de microcentrífuga siliconizados estéreis. Tubos individuais foram congelados a -20°C até o uso.

[0138] Para a precipitação de DNA nas micropartículas de ouro preparadas, um tubo de ouro foi descongelado para cada 10 placas a ser bombardeada. O tubo foi sonificado em um banho de água ultrassônico durante 15 segundos, turbilhonado no dedo, e em seguida punccionado na superfície do capuz de fluxo laminar para reunir todas as gotas no fundo. Para obter uma relação molar de 20:1 de doador para constructos de dedo de zinco, 4,75 µg de DNA doador (pDAB104182) foram pré-misturados com 0,25 µg de dedo de zinco (pDAB105941), em seguida adicionados ao ouro, ao mesmo tempo em que pipetando para cima e para baixo. Cinquenta µL de 2,5 M de cloreto de cálcio (anidro) foram adicionados, ao mesmo tempo em que pipetando para cima e para baixo, e 20 µL de 0,1 M de espermidina (base livre) foram adicionados, ao mesmo tempo em que pipetando para cima e para baixo. O tubo foi colocado sobre uma ligação de Turbomix™ para um Vortex-Genie® fixado em 2, e deixado agitar durante 10 minutos em temperatura ambiente. O tubo foi removido do agitador e deixado

assentar durante 3 a 5 minutos antes de ser centrifugado durante 15 segundos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi removido, 250 µL de etanol frio (100 %) foram adicionados e o tubo foi turbilhonado em dedo para desalojar a pélete e assegurar uma suspensão uniforme. As micropartículas revestidas de DNA assentaram durante 3 a 5 minutos, e o tubo foi centrifugado novamente durante 15 segundos a 5.000 rpm. A pélete foi ressuspensa em 120 µL de etanol frio (100 %), e turbilhonado em dedo para assegurar a dispersão. Os macroveículos foram colocados em macroveículo suportes, autoclavados para esterilidade, revestidos com 10 µL da solução preparada e deixados secar completamente antes do bombardeio.

[0139] O bombardeio de embriões foi feito usando um PDS-1000™ (Bio-Rad) por especificações do fabricante a 62,27 kg/cm² (900 psi) sob 28 polegadas de vácuo a uma distância de 6 cm da tela de interrupção. Cada amostra foi bombardeada uma vez, e em seguida retornada para 50 µmol/m²s 24 horas de iluminação durante a noite a 28°C. No dia seguinte, os embriões foram transferidos para o 'meio restante' fresco durante 7 dias sob as mesmas condições de temperatura e iluminação. Os embriões foram, subsequentemente, transferidos para 'meio de sel-5 Bi' ('meio de restante com a adição de 5 mg/L de Bialafos) durante 7 dias, transferidos uma segunda vez para o meio durante 14 dias e em seguida transferidos para 'meio *pre-regen*' (vitaminas e sais de MS, 30 g/L de sacarose, 700 mg/L de L-prolina, 15 mg/L de nitrato de prata, 500 mg/L de MES, 100 mg/L de hidrolisado de caseína, 100 mg/L de mio-inositol e 3,3 mg/L de dicamba, 2,5 mg/L de ABA, 1 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de NAA e 5 mg/L de Bialafos ajustados para pH 5,8 e solidificados com 2,3 g/L de Gelzan) durante 7 dias sob as mesmas condições de temperatura e iluminação. Os tecidos foram em seguida transferidos para 'meios de *regen*' (vitaminas e sais de MS, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-insitol e 5 mg/L de Bialafos ajusta-

dos para pH 5,8 e solidificados com 2,3 g/L de Gelzan) sob um fotoperíodo de 16/8 luz/escuro com 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de iluminação durante 14 dias a 28°C. As mudas foram transferidas para 'meio robusto de planta' (vitaminas e sais de MS, 30 g/L de sacarose, 500 mg/L de MES e 100 mg/L de mio-inositol ajustados para pH 5,8 e solidificados com 2,3 g/L de Gelzan) sob 150 a 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de iluminação a 28°C usando o mesmo fotoperíodo. Uma vez que as plantas cresceram em pelo menos 8 cm, uma seção de 2 cm de tecido de folha foi coletada em gelo úmido, e liberada para um ambiente frio de 4°C para análise. As mudas foram em seguida transplantadas no solo e transferidas para a estufa e analisadas por meio de análise molecular.

Eventos selecionados de bialofos de análise molecular

Isolamento de DNA genômico para qPCR de tecido de calo

[0140] As amostras de tecido foram coletadas em placas de coleta de 96 cavidades (Qiagen) e liofilizadas durante 48 horas. A ruptura de tecido foi realizada com um pulverizador de tecido Kleco™ (Garcia Manufacturing, Visalia, CA) em Biosprint96 RLT lysis buffer™ com uma conta de aço inoxidável. Após a maceração de tecido, o DNA genômico foi isolado em um formato de alta produtividade usando o Biosprint96 Plant kit™ (Qiagen) e o Biosprint96 extraction robot™. O DNA genômico foi em seguida diluído em 2 ng/ μL .

Determinação de número de cópia

[0141] O número de cópia de gene e o ensaio de ruptura foram feitos como descrito no EXEMPLO 7. A análise de controles não alvejados e eventos que não são alvejados ou rompidos mostrou um alvo para relação de referência na faixa de 0,4 a 0,6; os eventos rompidos ou alvejados mostraram um alvo para relação de referência na faixa de 0,2 a 0,35 (Figura 12).

Tabela 11

Iniciadores e sondas para qPCR.

Nome	SEQ ID NO:	Sequência de Oligo	Sonda (Fluoróforo/ Supressor)
MAS604	53	ACACGGCACACACGGCGACATTCA	---
MAS606	54	AGGGCAGTGGCCAGTGTTCCCTGTG	---
UPL69	---	Veja Roche	Veja Roche
IVF-Taq	55	TGGCGGACGACGACTTGT	---
IVR-Taq	56	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	---
IV-Sonda	57	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC	HEX/BHQ
TQPATS	62	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT	---
TQPATA	63	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT	---
TQPATFQ	64	GGTGTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG	CY5/BHQ2
ZGP3S	65	CCTGCTCCACTACAGTACAA	---
ZGP3A	66	GTCCAAGAAGGTGACCTTCTC	---
TQZGP3	67	AGATCACCGACTTTGCGCTCTTT	6FAM/BHQ1

PCR *in-out* de Loco Específico

[0142] A PCR *in-out* de loco específico foi feita como descrito no EXEMPLO 5.

Tabela 12

Sequências de iniciador para PCR *in-out*.

Nome	SEQ ID NO:	Sequência de Oligo
E32-5F3	SEQ ID NO:68	GAAGGCAAAACGAATATAAGTGCATTCCGG
E32-OLP-F3	SEQ ID NO:69	TCTACAGTGAACCTTTAGGACAGAGCCA
E32-OLP-R1	SEQ ID NO:70	TCGTGGATAGCACTTTGGGCT
E32-3R2	SEQ ID NO:71	GCCCTTACAGTTCATGGGCG

[0143] Os tamanhos de amplificação esperados para *amplicon* de final 5' eram 1.874 bp e o de final 3 eram 2.089 bp. As faixas de PCR foram excisados e colocadas em sequência. Os dados de sequência resultantes confirmaram que os *amplicons* continham as sequências de junção cromossômicas doadoras do loco E32 genômicas esperadas.

Southern blot

[0144] DNA dos eventos que mostrou ruptura positiva e PCR *in-*

out foi analisado por *Southern blots* para confirmar a inserção doadora intacta no alvo. DNA foi digerido com NcoI e sondado com flaqueamento de DNA genômico fora dos braços de homologia (Figura 14). Uma faixa em 1.950 bp foi prevista para o loco não alvejado, endógeno e uma faixa de 4.370 bp foi prevista para um loco alvejado.

[0145] Para *Southern*s, o DNA genômico (de 1 µg a 5 µg) foi digerido em Tampão 1X 3 (New England BioLabs) com 50 unidades de NcoI (New England BioLabs) em um volume final de 125 µL. As amostras foram incubadas a 37° C durante a noite. O DNA digerido foi concentrado por reprecipitação com Quick Precipitation Solution™ (Edge Biosystems) de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. O digesto recuperado foi ressuspenso em 30 µL de tampão de carregamento 1X e incubado a 65°C durante 30 minutos. As amostras ressuspensas foram carregadas sobre um gel de agarose a 0,8 % preparado em TAE 1X (0,8M de acetato de Tris [pH8,0]/ 0,04 mM de EDTA) e eletroforesado em tampão de TAE 1X. O gel foi sequencialmente submetido à desnaturação (0,2 M de NaOH/0,6M de NaCl) durante 30 minutos, e à neutralização (0,5 M de Tris-HCl [pH7,5]/1,5M de NaCl) durante 30 minutos. A transferência de fragmentos de DNA foi realizada por absorção passiva da solução 20X SSC durante a noite através do gel sobre Immobilon NY+™ tratado (Millipore). Após a transferência, a membrana foi brevemente lavada com 2X SSC, reticulada com um StrataLinker 1800™ (Stratagene), e cozida a 80°C durante 1 hora.

[0146] As manchas foram incubadas com solução de pré-hibridização (Perfect Hyb plus™, Sigma) durante 1 hora a 65° C em garrafas rolantes de vidro usando um modelo 400 Hybridization Incubator™ (Robbins Scientific). Para a preparação de sonda, a sequência genômica fora da região de homologia do doador foi amplificada por PCR com iniciadores (Tabela 13) e purificada a partir de géis usando um QIAquick gel extraction kit™ (Qiagen). O fragmento foi rotulado com 3000 Ci/mmol

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Perkin/Elmer/BLU513H) usando Prime-IT® II Random Primer labeling kit™ (Stratagene) de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. As manchas foram hibridizadas durante a noite a 65°C com sonda desnaturada em contagens de aproximadamente 2×10^6 por mL/tampão de hibridização. Após a hibridização, as manchas foram lavadas a 65° C com 0,1XSSC/0,1% de SDS durante 40 minutos. As manchas foram expostas usando telas do imageador de fósforo (Molecular Dynamics) e imageadas usando um Storm Imaging System™ (Molecular Dynamics, Storm 860™).

Tabela 13

Iniciadores usados para fazer sonda *Southern*.

Nome	SEQ ID NO:	Sequência de Oligo
MAS600	SEQ ID NO:72	TGTTTATAGAGCCTATTGGATACA
MAS603	SEQ ID NO:73	AGTGCATTCCGGATTACTGTTTAGTC

[0147] Um total de 912 eventos foi analisado por ruptura e PCR *in-out* e 16 foram confirmados ser alvejados com base em análise de *Southern*. A frequência de alvejamento para um fragmento doador dentro do loco genômico E32 foi calculada ser de 1,8 %.

[0148] Embora a descrição tenha sido fornecida em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo com os propósitos de clareza de entendimento, será evidente para aqueles versados na técnica que, várias mudanças e modificações podem ser praticadas sem afastar-se do espírito e escopo da descrição. Conseqüentemente, as descrições e exemplos anteriores não devem ser construídos como limitantes.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para integração de uma ou mais sequências de ácido nucleico exógeno no genoma de uma célula de milho tendo uma localização E32, caracterizado pelo fato de que compreende: fazendo uma clivagem de filamento duplo na localização E32 usando um sítio nuclease específico, ligação na clivagem de um polinucleotídeo compreendendo uma ou mais sequências exógenas no genoma da célula de milho dentro da localização E32.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sítio nuclease específico compreende uma ou mais nucleases de dedo de zinco selecionadas do grupo mostrado na tabela 1A

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de expressão de um produto de uma ou mais sequências exógenas.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de expressão de um produto de uma ou mais sequências exógenas.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais sequências de ácido nucleico exógeno compreendem uma sequência de codificação, uma sequência regulatória, ou um sítio alvo quanto a um domínio de ligação de DNA.

6. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que uma ou mais sequências de ácido nucleico exógeno compreendem uma sequência de codificação, uma sequência regulatória, ou um sítio alvo quanto a um domínio de ligação de DNA.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que uma ou mais sequências de ácido nucleico exógeno compreendem uma sequência de codificação, uma sequência regulatória, ou um sítio alvo quanto a um domínio de ligação de DNA.

8. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que uma ou mais sequências de ácido nucleico exógeno compreendem uma sequência de codificação, uma sequência regulatória, ou um sítio alvo quanto a um domínio de ligação de DNA.

9. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação codifica um produto que confere: resistência a herbicida; tolerância a herbicida; resistência a inseto; tolerância a inseto; resistência à doença; tolerância à doença; tolerância à tensão; resistência à tensão; uma mudança na tensão oxidativa; produções aumentadas de óleo; uma mudança no teor de alimento e maquiagem; uma mudança na aparência física; esterilidade masculina; *drydown*; capacidade de padronização; fecundidade; uma mudança na quantidade ou qualidade de milho; uma mudança na qualidade de óleo; uma mudança na qualidade ou quantidade de proteína; uma mudança na composição de aminoácido ou combinações dos mesmos.

10. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação codifica um produto que confere: resistência a herbicida; tolerância a herbicida; resistência a inseto; tolerância a inseto; resistência à doença; tolerância à doença; tolerância à tensão; resistência à tensão; uma mudança na tensão oxidativa; produções aumentadas de óleo; uma mudança no teor de alimento e maquiagem; uma mudança na aparência física; esterilidade masculina; *drydown*; capacidade de padronização; fecundidade; uma mudança na quantidade ou qualidade de milho; uma mudança na qualidade de óleo; uma mudança na qualidade ou quantidade de proteína; uma mudança na composição de aminoácido ou combinações dos mesmos.

11. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação codifica um produto que

confere: resistência a herbicida; tolerância a herbicida; resistência a inseto; tolerância a inseto; resistência à doença; tolerância à doença; tolerância à tensão; resistência à tensão; uma mudança na tensão oxidativa; produções aumentadas de óleo; uma mudança no teor de alimento e maquiagem; uma mudança na aparência física; esterilidade masculina; *drydown*; capacidade de padronização; fecundidade; uma mudança na quantidade ou qualidade de milho; uma mudança na qualidade de óleo; uma mudança na qualidade ou quantidade de proteína; uma mudança na composição de aminoácido ou combinações dos mesmos.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação codifica um produto que confere: resistência a herbicida; tolerância a herbicida; resistência a inseto; tolerância a inseto; resistência à doença; tolerância à doença; tolerância à tensão; resistência à tensão; uma mudança na tensão oxidativa; produções aumentadas de óleo; uma mudança no teor de alimento e maquiagem; uma mudança na aparência física; esterilidade masculina; *drydown*; capacidade de padronização; fecundidade; uma mudança na quantidade ou qualidade de milho; uma mudança na qualidade de óleo; uma mudança na qualidade ou quantidade de proteína; uma mudança na composição de aminoácido ou combinações dos mesmos.

13. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a sequência exógena é escolhida do grupo que consiste no gene PAT e o gene ADD-1.

14. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a sequência exógena é escolhida do grupo que consiste no gene PAT e o gene ADD-1.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo também compreende sequências de

nucleotídeo que são homólogas às sequências na localização E32.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as sequências de nucleotídeo homólogas flanqueiam a sequência exógena.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo também compreende um promotor.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais sequências de ácido nucleico exógenas integradas são transmitidas para progênie em gerações subsequentes.

19. Planta de milho ou parte de planta de milho, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais sequências exógenas integradas na localização E32 de acordo com o método como definido na reivindicação 1.

20. Semente de milho, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais sequências exógenas integradas na localização E32 de acordo com método como definido na reivindicação 1.

FIG. 1

Descreve a relação dos ZFNs designados a ligar o loco genômico da inserção no evento de milho DAS-59132. Seis ZFNs (E32 ZNF 1-6) foram identificados a partir do ensaio de levedura e quatro ZFNs foram avançados para análise em plantas.

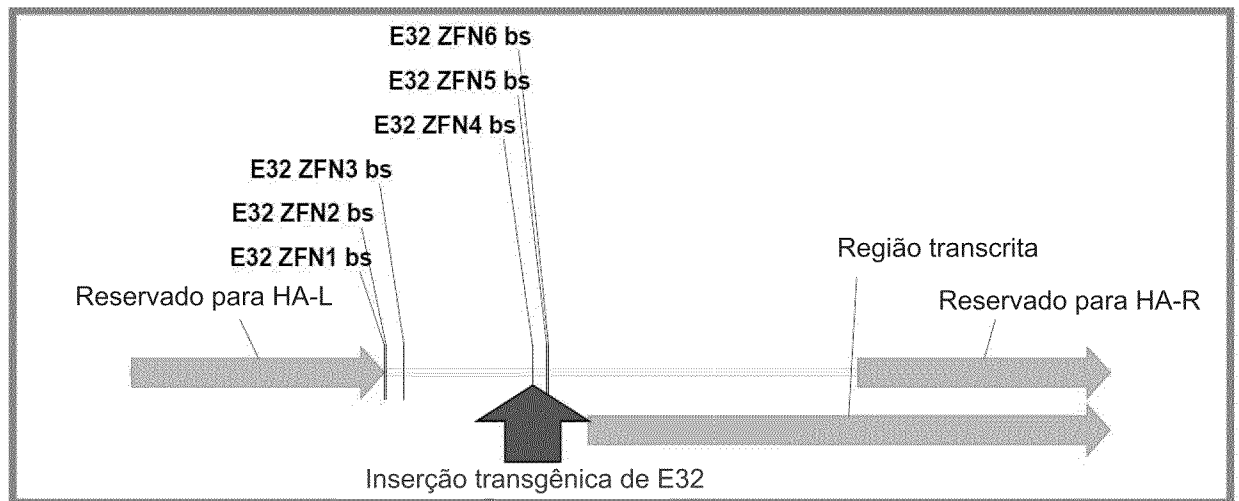


FIG. 2

Plasmídeo *map* pDAB1050906

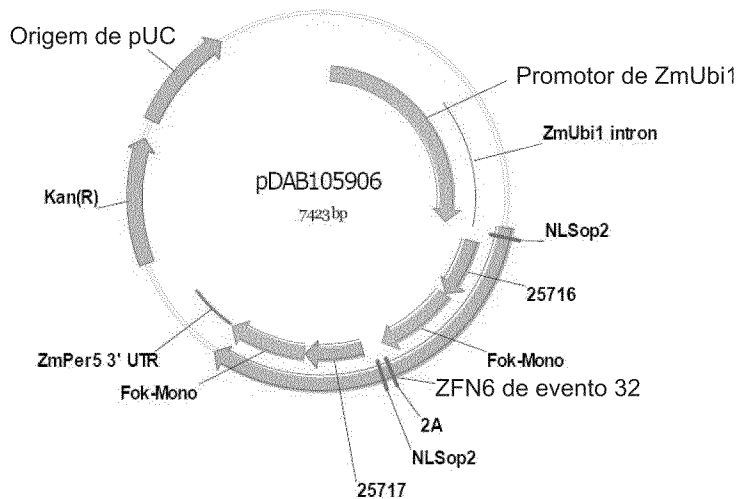


FIG. 3

Plasmídeo *map* pDAB111809

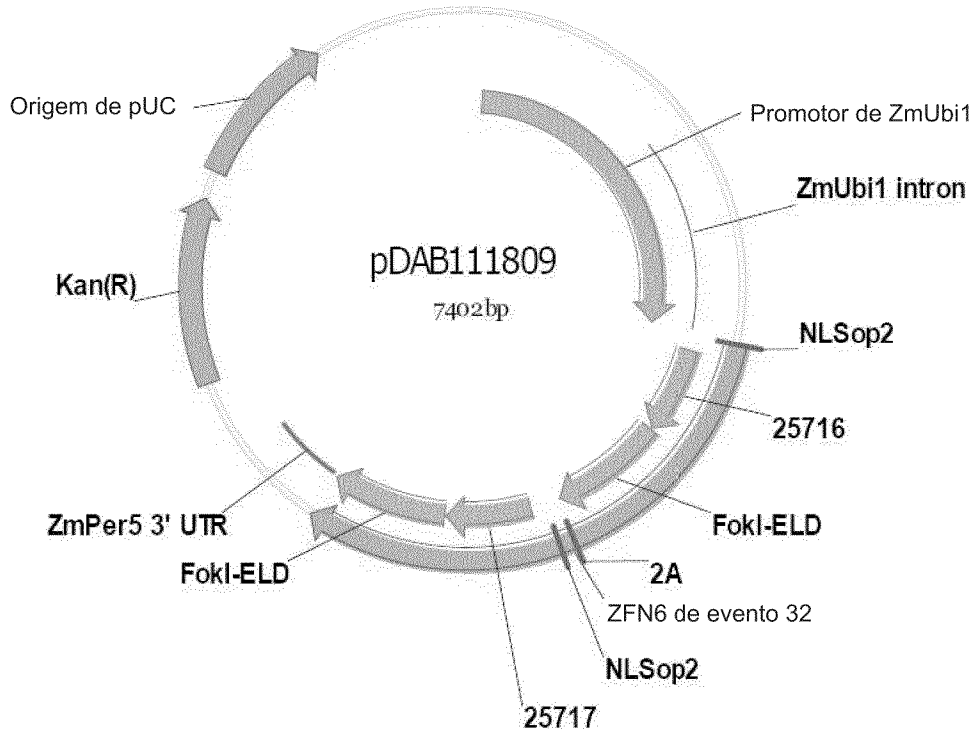


FIG. 4

Plasmídeo *map* pDAB100655

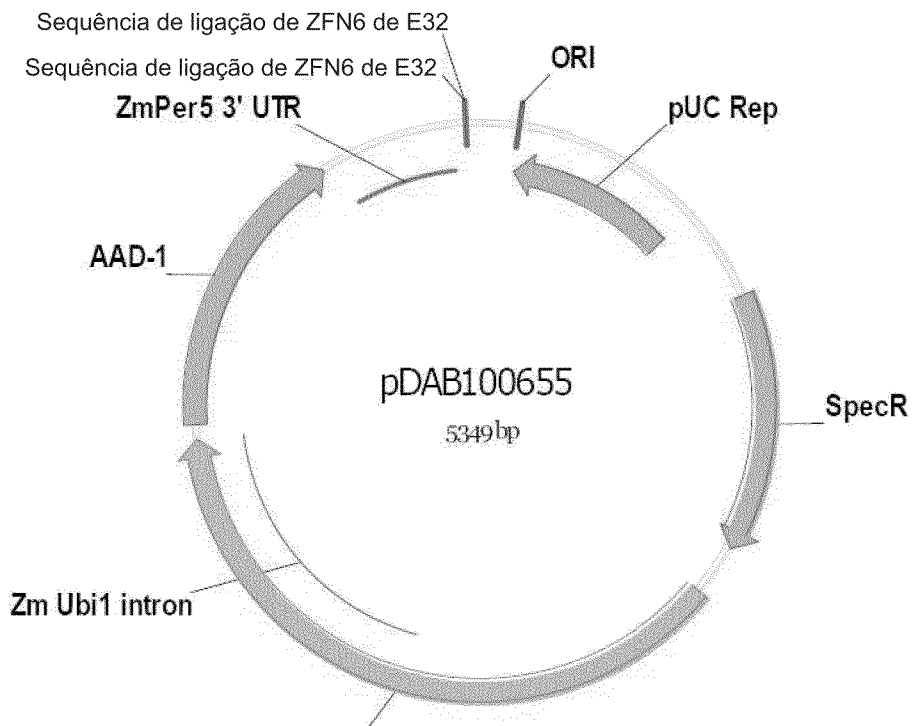


FIG. 5

Rompimento de loco ZFN de DAS59132 de Evento de milho
(as setas indicam um loco genômico rompido)

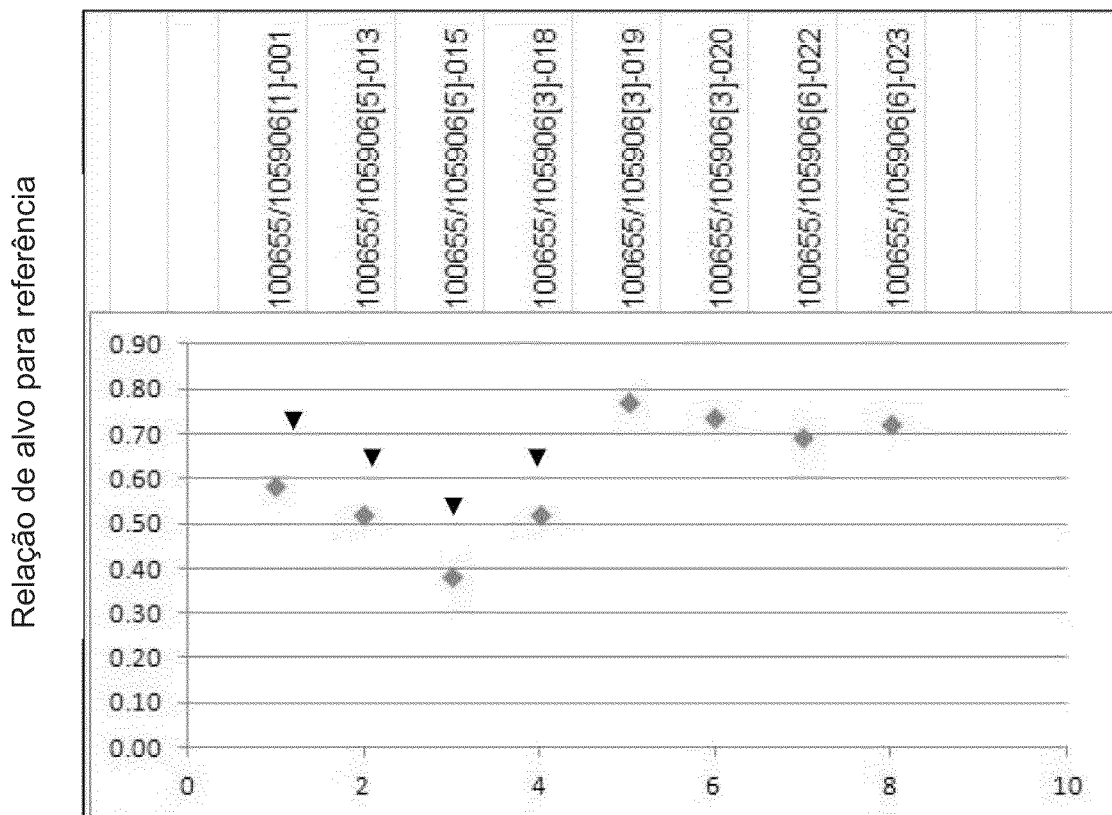


FIG. 6

Plasmídeo map para pDAB108688 (vetor de controle)

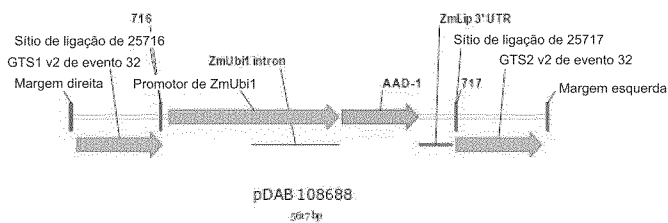


FIG. 7

Plasmídeo map para pDAB108690 (vetor de alveijamento);

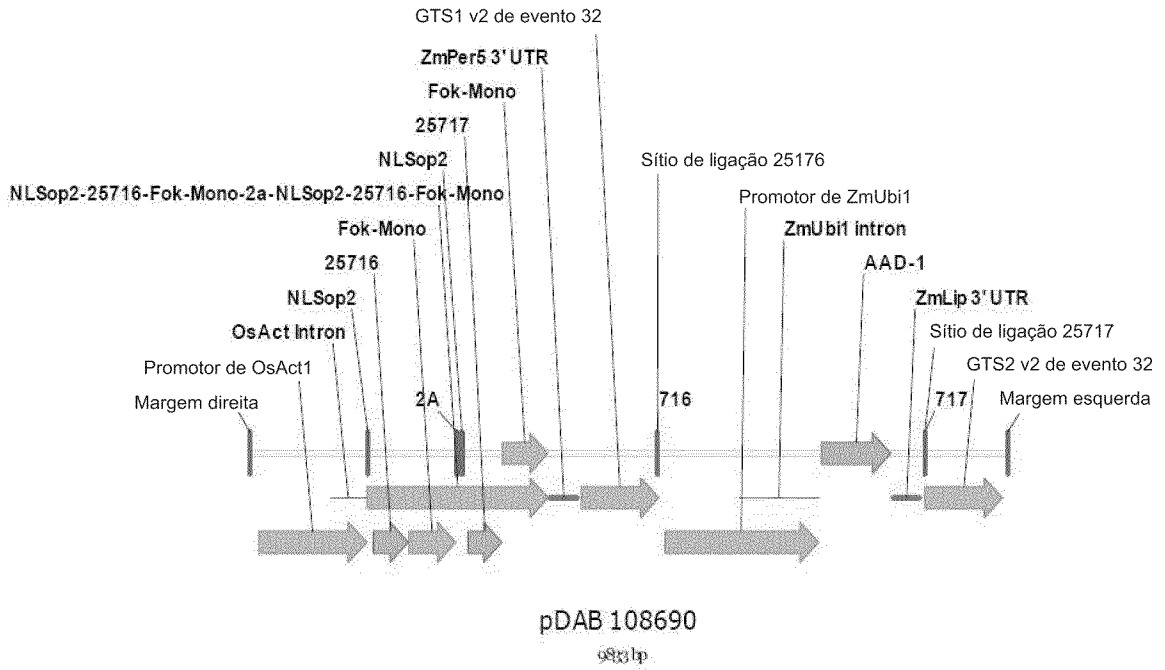
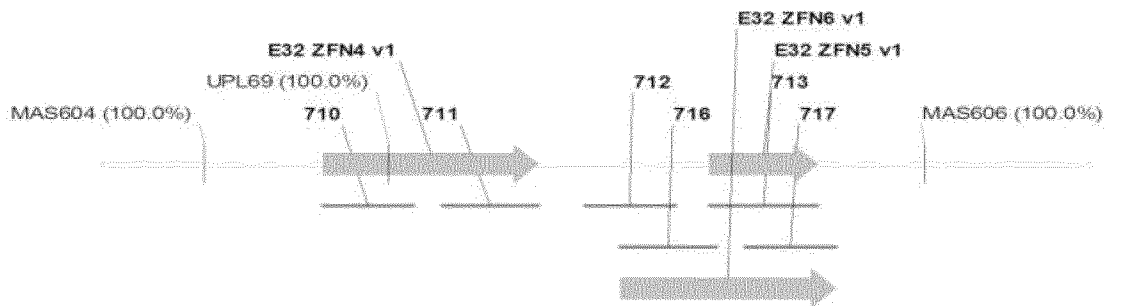


FIG. 8

Localização do iniciador e sonda para qPCR de rompimento de ZFN



Fragmento de evento 32 anotado *ma*

166 bp (Molécula 3102. bp)

FIG. 9

Ensaio de rompimento de ZFN (os colchetes superiores indicam eventos não rompidos e os colchetes inferiores mostram eventos rompidos);

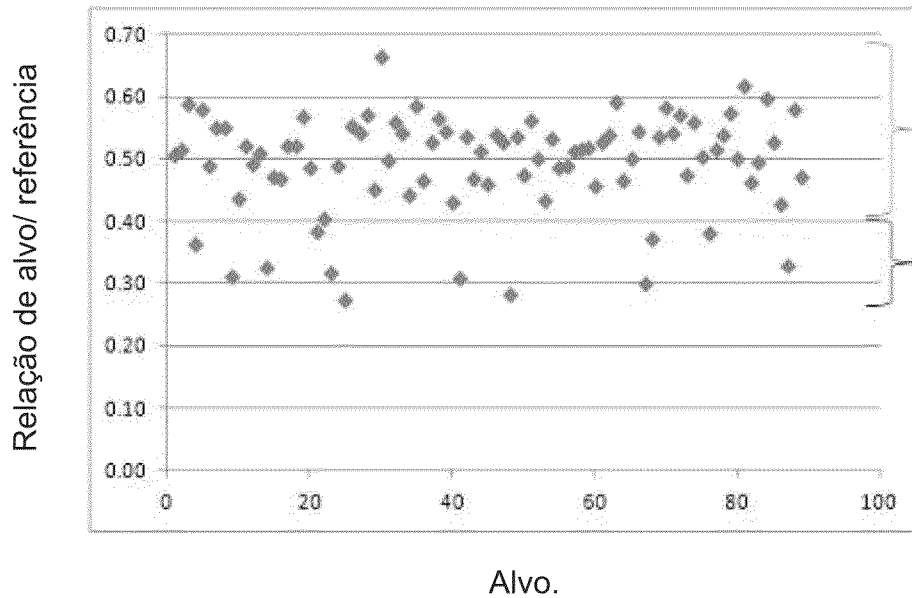


FIG. 10

Plasmídeo map de pDAB104179

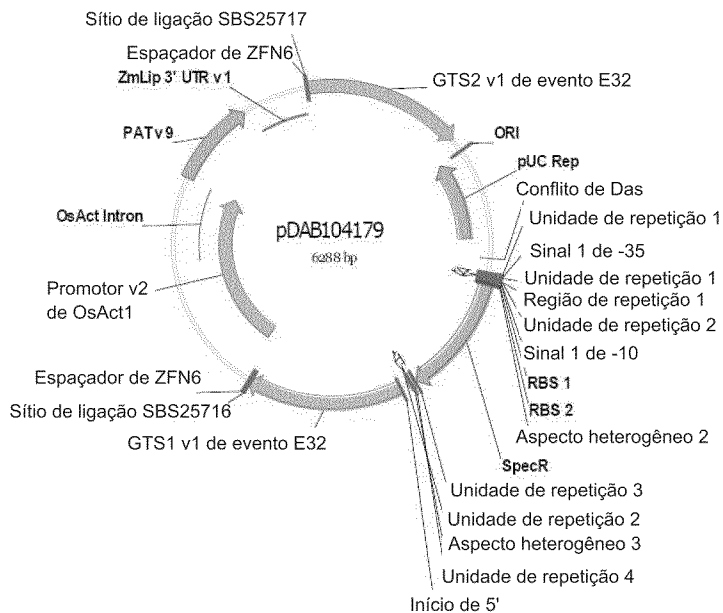


FIG. 11

Localização de iniciador e sonda para qPCR de rompimento de ZFN

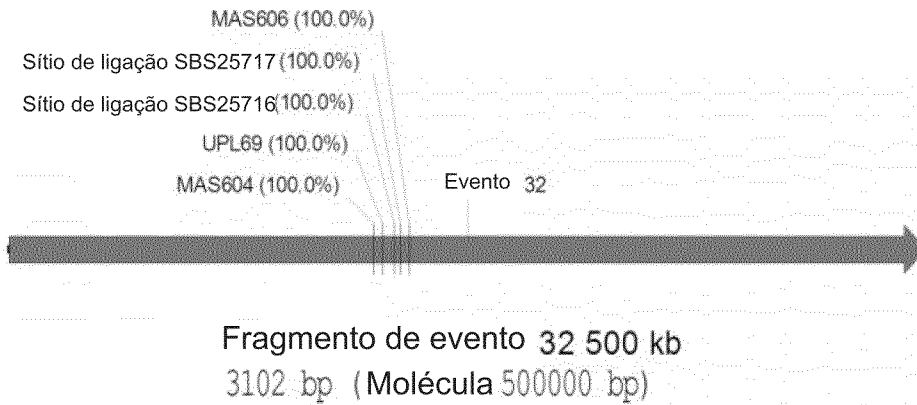


FIG. 12

Ensaio de ZFN (os colchetes superiores indicam eventos negativos não rompidos e os colchetes inferiores mostram eventos rompidos);

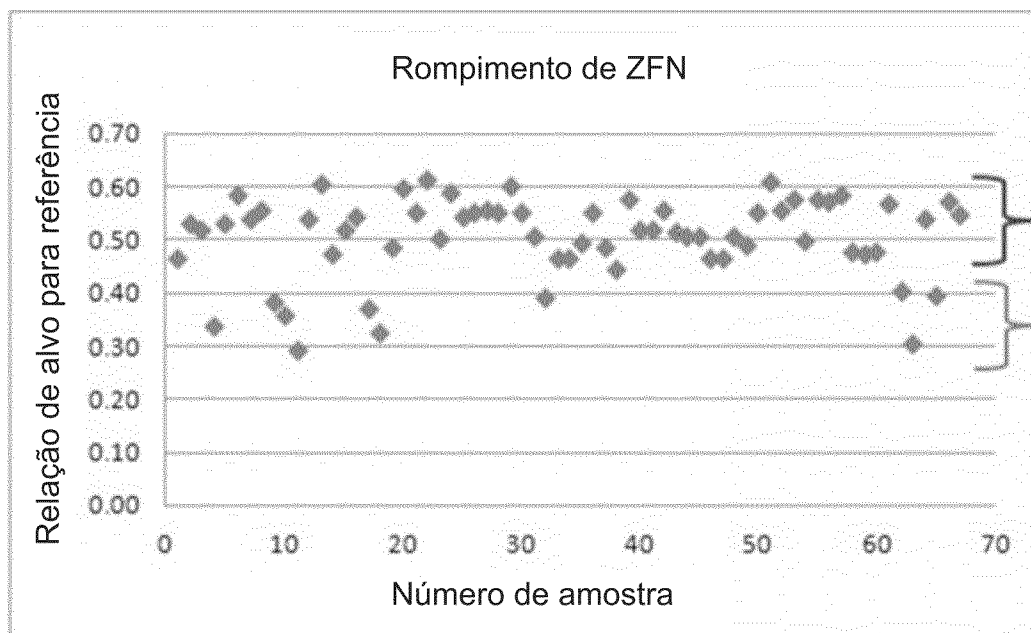


FIG. 13

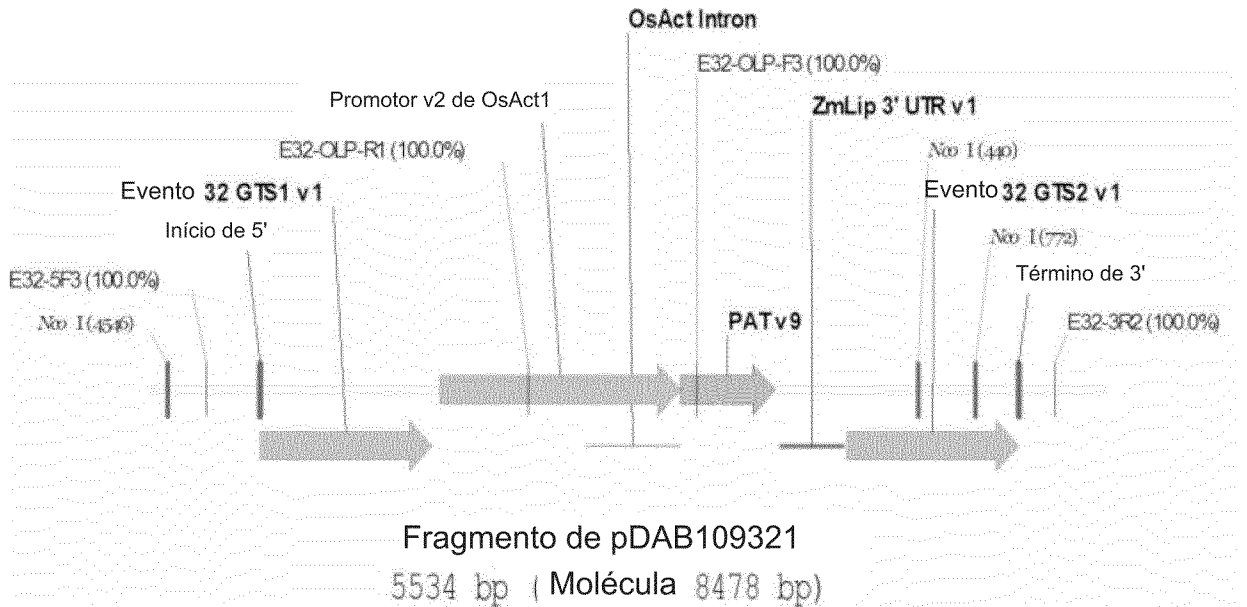
Localização do iniciador para PCR *in/out*

FIG. 14

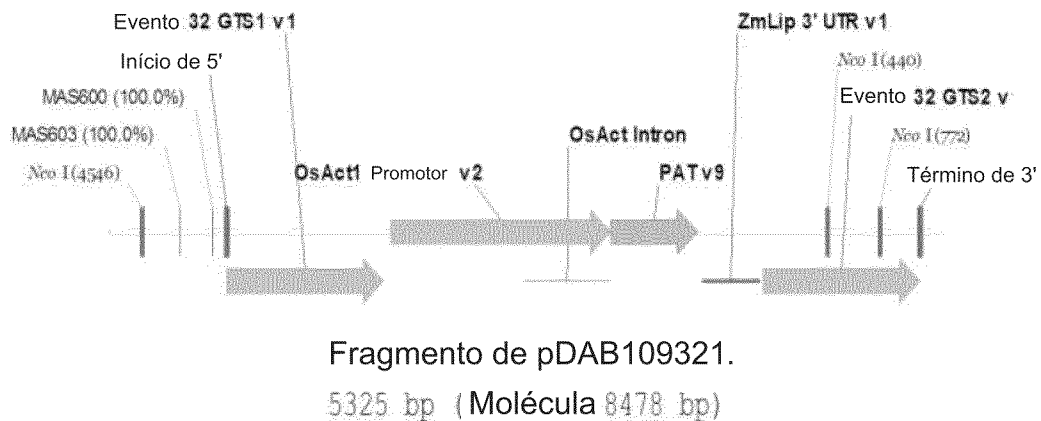
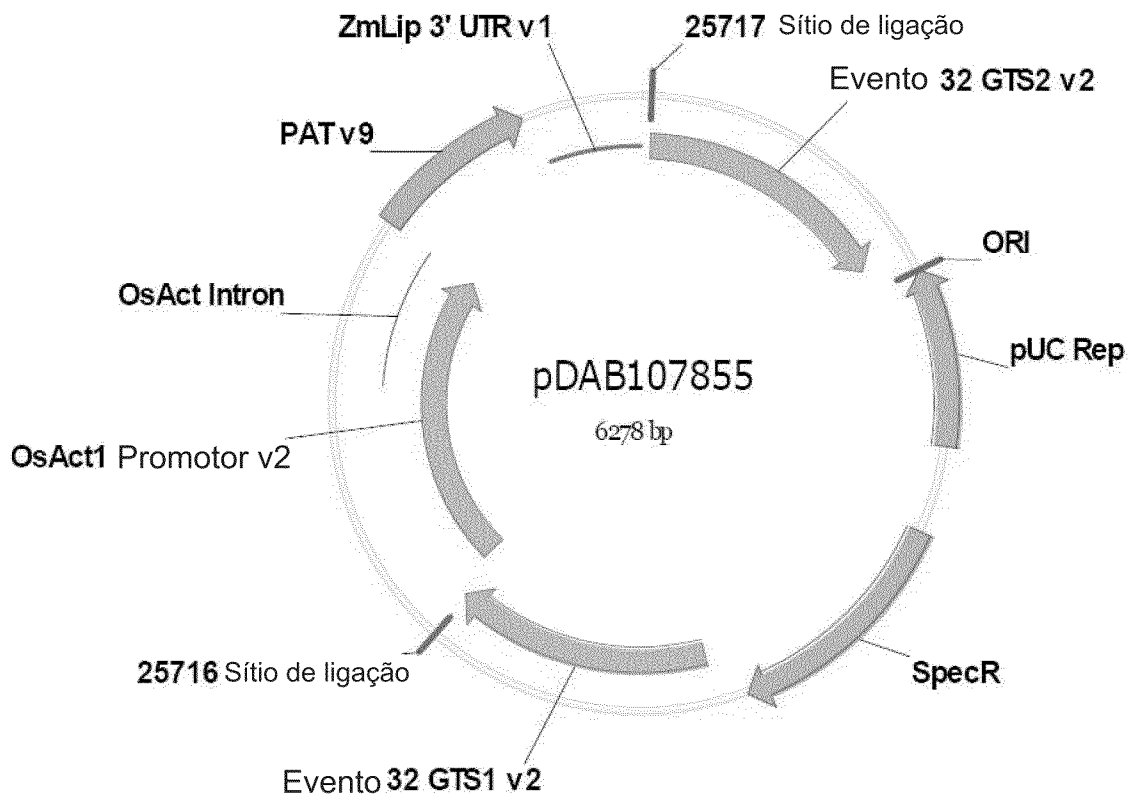
Estratégia de análise *Southern*. Localização de sítios de corte de enzima e iniciadores para a geração de sonda;

FIG. 15

Plasmídeo *map* de pDAB107855



RESUMO

Patente de Invenção: "**DIRECIONAMENTO PRECISO DE UM GENE PARA UM LOCUS ESPECÍFICO EM MILHO**".

A presente invenção reivindica os métodos para a integração estável de DNA exógeno em uma localização específica, E32, no genoma de milho através do uso de nucleases de dedo de zinco. Plantas e partes de planta de milho que foram transformadas pelos métodos da invenção são reivindicadas. A invenção é útil para a criação de características desejáveis tais como, resistência a herbicida, tolerância a herbicida, resistência a inseto, tolerância a inseto, resistência à doença, tolerância à doença, tolerância à tensão, e resistência à tensão no milho. A localização E32 representa um sítio superior para a inserção de genes estranhos porque os fenótipos agronômicos nativos não são perturbados.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



4F1F5AA16252B9E7

Campo 2



F4B05B5189C2FC2C

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P202251.txt
- Data de Geração do Código: 13-12-2013
- Hora de Geração do Código: 15:29:31
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4F1F5AA16252B9E7
 - Campo 2: F4B05B5189C2FC2C

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> DIRECIONAMENTO PRECISO DE UM GENE PARA UM LOCUS ESPECÍFICO EM MILHO

<130> 74381

<140> BR102013032200-8

<141> 13/12/2013

<150> US61/736,856

<151> 13/12/2012

<150> US61/820,231

<151> 07/05/2013

<160> 73

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 3102

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Locus do evento 32

<400> 1

agttgggaag gcaaaacgaa tataagtgca ttcggattac tgtttagtcg agtcatattt 60

aaggaattca ttgtaaattgt tctaacctaa cctaagtatt aggcagctat ggctgatatg 120

gatctgattg gacttgattt atccatgata agtttaagag caactcaaag aggttaggta 180

tatatggttt tgtaaaggta aatttagtta atattagaaa aaaaaagtgt atccaatagg 240

ctctataaac aactcttcaa atttagtggc tttctatcca tccaccttg ctctctattt 300

ttggatagcc tgatttactc tctattcagt ccgtaggttt aatgagtctg ttggattagc 360

ctacactttt tctgtaaaat ctattttaga tagtagctaa atcagtaa at ttggctagta 420

tttttagcta ttctcttgga gtttgctata agaccagaac atgtaaattg gaagtttctg 480

gacccggacg agaatgcatg acaaatccag agtattgatg atggaattca cctattttac 540
ccgactcttc cattgtgtcc atttctcacc atccccgggc gctttctgca tccggtacag 600
ctgacatgac acgttcacgc gttacatggc tgatggctca caagtcaccc ccacatgtct 660
agtgttcgcc caggcagatc gtccctcgcc tgcctcgccg tgctcttgcc gccgcttgct 720
tgggccctgc tggcgcccgc tgccgatcac acggcctacg cgggtgcaggc agcgccaccg 780
aaccgcagct cttgttgtgc cgataggtgg cagtggcagc ggcactggca cggcacgcga 840
tcgatcgctc cgctcatctg ctgacagtgg atagagcagc gttggccggtt ggggccggat 900
ctccgtgaag cggtcgtccc tgctgtactg tgccgctatg gcgtgtcgct ttcgccatgt 960
tttcttttct ttttttttcc tttttctttt tgctagggcg gtttctcggtt cgctggtaac 1020
agggaccact tcggttgatc cgttgaatth actgaaagag atgggaaatg tcgctgtgcc 1080
cgggacattg aatgagatgt tgtgtaagtg aatatggctt tagccttttg cgagtggggc 1140
ggcaatgcac ggcataaact ataatttccg gtcaaaacttt tgtgtggaaa tggatgctaa 1200
acgaacacaa accgggttta aaccagaggc cgacacggca cacacggcga cattcaccgc 1260
cggcttcttc cgtcgccact cggcacaagg ctcatcagtc gccgatgccc gatgcgatca 1320
acggaagcgg atggcccgtt tctttagaat tggcacagga aactggcca ctgcccttga 1380
tgtgcaatta tgcctgcgaa agcctaggca acacacgcga ataaacgagc gaatgacacg 1440
gaaagctgat gtggtatgaa ttatacaaca ttatgggcca aaatattatt ctatccacca 1500
ttgtgtagcc acagcatcgg tatttgagtt gtgcgaggac aaatccctcg tgagggtcaaa 1560
aacagcaaat aataaaccca tctcctgaag acaccaaaaa aaaggagcag ctctcctgtg 1620
caatgaacaa gcgtcacaag aaaagggagc acgtaaataa cctcttcaat tgcttcagca 1680
tgaaaagaac ggggaagaaat gcaagtctac agaggaaagt gcagctgttt cggctgccat 1740
ggcaagttcc tacatgggag aggaaaagct gaactggatt ccagctctcg cgctgtcatg 1800
ctcagcttgc tttaggatgc ggcaatagtt cacctggatg aaaaagatac aagttagtct 1860
tgaagcagtc gagtggacat ccaaagtatc aaaatcgaaa gcttgtaaat ggggaaggaa 1920

atatacctct acccggaaaa gtttggtagg caaaataatc ccaacgccag cagagctccg 1980
 gaacgtttgc cgaaattcag aagccgaaaa gttcttgtac tcaccctccg acagtttgcg 2040
 aaggtttcca gcagtaagga atgcggtggc atggattcca gcgtctctga atatcttgag 2100
 gggcagatca aaagaaaggt cagcgaaggc agacacggcc agatcacctc ccaagtaatc 2160
 ccttccaggg tcagccgagc cactctccga gttattaagg acatgcctcc gcgcctctgt 2220
 tgggccaact ccccttaatc tgaaaccag cagagatgac ggtccgcca agctgcacac 2280
 tggagaagaa ttacctcaa gataaaacct ctctggcact gatgaagtcg aattcatgaa 2340
 tccccctgca agcggtaaaa tgacaccgc tctacacca acgttgagag cagcactata 2400
 aaatcccaaa ggcacagcac cacgtacatc gaactcctga gagcaaacc aacggcaata 2460
 tttttgtaat agtgatggtc agaactgaga agatcagata aaattataca ctgatgcaat 2520
 tatttcatag ttctgcccac gaactgtaag ggctagacaa agcaaaaagt aagacatgaa 2580
 gggcaagaga ataacctgcc ggaaatatct caatcctttg ctattccata gaccaccaac 2640
 ttgagaagtt gactgaaacg catatccttt cgttggccta agatgtgaat ccctcttacc 2700
 aatcttgat gtgtacttca atgcagaaag aaggttatgc cctaactgcc tccttatggc 2760
 ctttgatgag acacgtgatg gatcagttaa ggtacgccac gcaaggttgt atgacaagtc 2820
 atggttcctt gttgacagca aaccaaataa aaggccaagt aggcgctcct tgtatgatga 2880
 aaacttcagc caatcttgtg atgacaaaga tgcccagacc atcaatggtg ttggtattga 2940
 tttaaacctc ggtaggcaga ctccaacacc aacctctggt gtttggccc aaccaaagga 3000
 tctgatgca tcccagatgt caccatagcc aaacaagttc ttcaacttaa gtgacccttc 3060
 cagcgaccaa gatcttgctt acaagagtgg caagcacagt ca 3102

<210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 2

cacaacaaga ctgcggttc ggtggcgc

28

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 3

gataggtggc agtggcagtg gcactggc

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 4

tatcggcaca acaagactgc gggttcgg

28

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 5

tggcagtggc agtggcactg gcacggca

28

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 6

cagcagatga gcggagcgat cgatcgcg

28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 7

cagtggatag agcagcgttg gccgttgg

28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 8

aggaagccgg cggatgaatgt cgccgtgt

28

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 9

cgtcgccact cggcacaagg ctcatcag

28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 10

atcgggcatc ggcgactgat gagccttg

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 11

gatcaacgga agcggatggc ccgcttct

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 12

tgatcgcac cggcgcgac gactgatg

28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de ligação de dedo de zinco

<400> 13

cggaagcggg tggcccgcct ctttagaa

28

<210> 14

<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 14

caggcagcgc caccgaac

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 15

cgatcgatcg cgtgccgt

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 16

ctggcacggc acgcgatc

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 17

cggagatccg gcccac

18

<210> 18

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 18
gacacggcac acacggcg 18

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 19
tcgggcatcg gcgactga 18

<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 20
actcggcaca aggctcat 18

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 21
cctgtgccaa ttctaaag 18

<210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 22
 gcagtgcatg ttatgagc 18

<210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 23
 caggacataa atgaactgaa tc 22

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 24
 tgttcgggtc cctctaccaa 20

<210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 25
 caacatccat caccttgact ga 22

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 26
cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 27
tggcggacga cgacttgt 18

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 28
aaagtttgga ggctgccgt 19

<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 29
cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 30
gcccttacag ttcattggcg 20

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 31
gaccaagtcc ttgtctggga ca 22

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 32
acaaacacgt cctccaaggc t 21

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 33

gaccaagtcc ttgtctggga ca 22

<210> 34
 <211> 226
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência sonda

<400> 34
 gtgcattcgg attactgttt agtcgagtca tatttaagga attcattgta aatggttctaa 60
 cctaacctaa gtattaggca gctatggctg atatggatct gattggactt gatttatcca 120
 tgataagttt aagagcaact caaagagggtt aggtatatat ggttttgtaa aggtaaattt 180
 agttaatatt agaaaaaaaa agtgtatcca ataggctcta taaaca 226

<210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 35
 acacggcaca cacggcgaca ttca 24

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 36
 agggcagtg cagtggttcc tgtg 24

<210> 37
 <211> 18

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 37
tggcggacga cgacttgt 18

<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 38
aaagtttggga ggctgccgt 19

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 39
cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 40
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 40
gaaggcaaaa cgaatataag tgcattcgg 29

<210> 41

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 41
 tcgtggatag cactttgggc t 21

<210> 42
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 42
 tctacagtga actttaggac agagcca 27

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 43

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Lys
 1 5

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 44

Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 45

Arg Ser Asp Asn Leu Arg Glu
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 46

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 47

Asp Thr Gly Ala Arg Leu Lys
1 5

<210> 48

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 48

Arg Ser Ala Asp Arg Lys Thr
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 49

Asp Arg Ser His Leu Ser Arg
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 50

Thr Ser Gly Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 51

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Hélices de reconhecimento de proteína de dedo de zinco

<400> 52

Gln Ser Ala Asn Arg Thr Lys
1 5

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 53

acacggcaca cacggcgaca ttca

24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 54

agggcagtggtg ccagtggttcc tgtg

24

<210> 55

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 55
tggcggacga cgacttgt 18

<210> 56
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 56
aaagtttgga ggctgccgt 19

<210> 57
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 57
cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 58
tgttcgggttc cctctaccaa 20

<210> 59
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 59
 caacatccat caccttgact ga 22

<210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência Iniciadora

<400> 60
 cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

<210> 61
 <211> 4431
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo pDAB104179

<400> 61
 tctctattca gtccgtaggt ttaatgagtc tgttggatta gcctacactt tttctgtaaa 60
 atctatttta gatagtagct aaatcagtaa atttggctag tatttttagc tattctcttg 120
 gagtttgcta taagaccaga acatgtaa at tggaagtttg tggaccogga cgagaatgca 180
 tgacaaatcc agagtattga tgatggaatt cacctatttt accogactct tccattgtgt 240
 ccattttctca tcatccccgg gcgctttctg catccggtag agctgacatg acacgttcac 300
 gcgttacatg gctgatggct cacaagtcac cccacatgt ctagtgttcg cccaggcaga 360
 tcgtcctcgg cctgcgctgc cgtgctcttg ccgcccgttg cttgggcccct gctggcgccc 420

gctgccgatc acacggccta cgcggtgcag gcagcgccac cgaacccgca gtcttgttgt 480
gccgataggt ggcagtgga gtggcactgg cacggcacgc gatcgatcgc tccgctcadc 540
tgctgacagt ggatagagca gcggtggccg ttggggcccg atctccgtga agcggtcgtc 600
cctgctgtac tgtgccgcta tggcgtgtcg ctttcgccat gttttctttt cttttttttt 660
tctttttctt tttgctaggg cggtttctcg ttogctggta acagggacca cttcggttga 720
tccgttgaat ttactgaaag agatgggaat ggtoctgtg cccgggacat tgaatgagat 780
gttggtgaag tgaatatggc tttagccttt tgcgagtggg gcggcaatgc acggcatgaa 840
ctataatttc cggtcaaact tttgtgtgga aatggatgct aaacgaacac aaaccgggtt 900
taaaccagag gccgacacgg cacacacggc gacattcacc gccggcttcc tccgctcgca 960
ctcggcaciaa ggctcatcag tcgccgatgc ccgatgcgat caacgtttat agcggccgca 1020
ttattatggc cggccattta aatatcgatt ctagtctcga ggtcattcat atgcttgaga 1080
agagagtcgg gatagtccaa aataaaacia aggtaagatt acctgggtcaa aagtgaaaac 1140
atcagttaaa aggtggtata aagtaaaata tcggtaataa aaggtggccc aaagtgaaat 1200
ttactctttt ctactattat aaaaattgag gatgtttttg tcggtacttt gatacgtcat 1260
ttttgtatga attggttttt aagtttatcc gcttttgaa atgcatatct gtatttgagt 1320
cgggttttaa gttcgtttgc ttttgtaaat acagagggat ttgtataaga aatatcttta 1380
aaaaaaccca tatgctaatt tgacataatt tttgagaaaa atatatattc aggcgaaatc 1440
tcacaatgaa caataataag attaaaatag ctttcccccg ttgcagcgca tgggtatttt 1500
ttctagtaaa aataaaagat aaacttagac tcaaaacatt tacaaaaaca acccctaaaag 1560
ttcctaaagc ccaaagtgct atccacgatc catagcaagc ccagcccaac ccaaccacaac 1620
ccaaccacc ccagtccage caactggaca atagtctcca cccccccca ctatcaccgt 1680
gagttgtccg cacgcaccgc acgtctcgca gccaaaaaaa aaaaaagaaa gaaaaaaaaag 1740
aaaaagaaaa aacagcaggt gggtcocgggt cgtgggggcc ggaaacgcga ggaggatcgc 1800
gagccagcga cgaggccggc cctccctccg cttccaaaga aacgcccccc atcgccaacta 1860

tatacataacc	ccccctctc	ctcccatccc	cccaacccta	ccaccaccac	caccaccacc	1920
tccacctcct	ccccctcgc	tgccggaoga	cgctcccc	ctccccctcc	gccgcgcgcg	1980
cgccggtaac	caccccgccc	ctctctcttt	tctttctcgc	tttttttttt	ccgtctcggc	2040
ctcgatcttt	ggccttggtg	gtttgggtgg	gcgagaggcg	gcttcgtgcg	cgcccagatc	2100
ggtgcgcggg	aggggcggga	tctcgcggct	ggggctctcg	ccggcgtgga	tccggcccgc	2160
atctcgcggg	gaatggggct	ctcggatgta	gatctgcgat	ccgccgttgt	tgggggagat	2220
gatggggggg	ttaaaatttc	cgccatgcta	aacaagatca	ggaagagggg	aaaagggcac	2280
tatggtttat	atTTTTatat	atTTctgctg	cttcgtcagg	cttagatgtg	ctagatcttt	2340
ctttcttctt	tttgtgggta	gaatttgaat	ccctcagcat	tgttcatcgc	tagtttttct	2400
tttcatgatt	tgtgacaaat	gcagcctcgt	gcggagcttt	tttgtaggta	gaccatgtct	2460
ccggagagga	gaccagttga	gattaggcca	gctacagcag	ctgatatggc	cgcggtttgt	2520
gatatcgтта	accattacat	tgagacgtct	acagtgaact	ttaggacaga	gccacaaaca	2580
ccacaagagt	ggattgatga	tctagagagg	ttgcaagata	gatacccttg	gttggttgct	2640
gaggttgagg	gtgttggtgc	tggtattgct	tacgctgggc	cctggaaggc	taggaacgct	2700
tacgattgga	cagttgagag	tactgtttac	gtgtcacata	ggcatcaaag	gttgggccta	2760
ggatccacat	tgtacacaca	tttgcttaag	tctatggagg	cgcaaggttt	taagtctgtg	2820
gttgctgтта	taggccttcc	aaacgatcca	tctgttaggt	tgcattgaggc	tttgggatac	2880
acagcccgtg	gtacattgcg	cgcagctgga	tacaagcatg	gtggatggca	tgatgttggt	2940
ttttggcaaa	gggattttga	gttgccagct	cctccaaggc	cagttaggcc	agttaccag	3000
atctgactga	gcttgagctt	atgagcttat	gagcttagag	ctcggctcga	gcgtgtgcgt	3060
gtccgtcgta	cgttctggcc	ggccgggctt	tgggcgcgcg	atcagaagcg	ttgcgttgcc	3120
gtgtgtgtgc	ttctggtttg	ctttaatttt	accaagtttg	tttcaaggtg	gatcgcgtgg	3180
tcaaggcccg	tgtgctttaa	agaccaccgc	gcactggcag	tgagtgttgc	tgcttgtgta	3240

ggctttggta cgtatgggct ttatttgctt ctggatggtg tgtactactt gggtttgttg 3300
 aattattatg agcagttgcg tattgtaatt cagctgggct acctggacat tgttatgtat 3360
 taataaatgc tttgctttct tctaaagatc tttagtgct actagattaa ttaactcgag 3420
 gtcgaccaac ggaagcggat ggcccgcttc tttagaattg gcacaggaac actggccact 3480
 gcccttgatg tgcaattatg cctgcgaaag cctaggcaac acacgcgaat aaacgagcga 3540
 atgacacgga aagctgatgt ggtatgaatt atacaacatt atgggcaaaa atattattct 3600
 atccaccatt gtgtagccac agcatcggta tttgagttgt gcgaggacaa atccctcgtg 3660
 aggtcaaaaa cagcaaataa taaaccatc toctgaagac accaaaaaaaa aggagcagct 3720
 cctcgtgtca atgaacaagc gtcacaagaa aagggagcac gtaaataacc tcttcaattg 3780
 cttcagcatg aaaagaacgg gaagaaatgc aagtctacag aggaaagtgc agctgtttcg 3840
 gctgccatgg caagttccta catgggagag gaaaagctga actggattcc agtcttcgag 3900
 ctgtcatgct cagcttgctt taggatgcgg caatagttca cctggatgaa aaagatacaa 3960
 gttagtcttg aagcagtcga gtggacatcc aaagtatcaa aatcgaaaagc ttgtaaatgg 4020
 ggaaggaaat atacctctac ccggaaaagt ttggtaggca aaataatccc aacgccagca 4080
 gagctccgga acgtttgccg aaattcagaa gccgaaaagt tcttgtaactc accctccgac 4140
 agtttcgcaa ggtttccagc agtaaggaat gcgtggccat ggattccagc gtctctgaat 4200
 atcttgaggg gcagatcaaa agaaaggtca gcgaaggcag acacggccag atcacctccc 4260
 aagtaatccc ttccagggtc agccgagcca ctctccgagt tattaaggac atgcctccgc 4320
 gcctctgttg ggccaactcc ccttaatctg aaaccagca gagatgacgg tccgcccaag 4380
 ctgcacactg gagaagaatt acctccaaga taaaacctct ctggcactga t 4431

<210> 62
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 62

acaagagtgg attgatgatc tagagaggt

29

<210> 63

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 63

ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt

29

<210> 64

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 64

ggtgttggg ctggtattgc ttacgctgg

29

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 65

cctgctccac taccagtaca a

21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 66
gtccaagaag gtgaccttct c 21

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 67
agatcaccga ctttgcgctc ttt 23

<210> 68
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 68
gaaggcaaaa cgaatataag tgcattcgg 29

<210> 69
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Iniciadora

<400> 69
tctacagtga actttaggac agagcca 27

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 70

tcgtggatag cactttgggc t

21

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 71

gcccttacag ttcattggcg

20

<210> 72

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 72

tgtttataga gcctattgga taca

24

<210> 73

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Iniciadora

<400> 73

agtgcatcgc gattactggt tagtc

25