

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 859**

51 Int. Cl.:
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07107017 .1**
96 Fecha de presentación: **26.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1908840**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA INTEGRACIÓN CROMOSÓMICA Y SUSTITUCIÓN DE LA SECUENCIA DE ADN EN CLOSTRIDIA.**

30 Prioridad:
03.10.2006 WO PCT/EP2006/066997

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
**METABOLIC EXPLORER
BIÔPOLE CLERMONT-LIMAGNE
63360 SAINT BEAUZIRE, FR**

72 Inventor/es:
**Soucaille, Philippe;
Figge, Rainer y
Croux, Christian**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 369 859 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la integración cromosómica y sustitución de la secuencia de ADN en clostridia.

5 **Antecedentes de la invención**

Clostridia son bacterias gram positivas, anaeróbicas y bajas en GC que se utilizan ampliamente en la industria por sus capacidades para producir disolventes, en particular butanol, etanol y acetona, pero también dióles como 1,3-propanodiol, ácidos orgánicos como ácido acético, butílico o láctico y vacunas.

10 La construcción de *Clostridia* recombinante es una parte importante del desarrollo en este campo. Las cepas de *Clostridium* están modificadas genéticamente para mejorar sus capacidades industriales.

15 Para realizar estas modificaciones, la recombinación homóloga es la técnica más utilizada en todo tipo de organismos. La transformación, transposición y recombinación homóloga en varios microorganismos se ha descrito extensamente en esta materia. Véase por ejemplo (Datsenko y Wanner; *PNAS*, 2000) (Fabret *et al.*, *Molecular Microbiology*, 2002) y el documento WO 01/71040 (Dupont de Nemours).

20 *Clostridia* no se pueden transformar de forma natural y los procedimientos actualmente disponibles para su transformación son ineficaces y no permiten la introducción de múltiples mutaciones. Esto ha impedido desarrollos industriales en este campo.

25 *Clostridia* producen normalmente ADNAsas extracelulares y enzimas de restricción que degradan el ADN extraño antes y después de la introducción en las células para transformación. Los procedimientos clásicos basados en la introducción de fragmentos de RCP que actúan bien en muchos microorganismos tal como *E. coli* o levadura, no son fiables en estos organismos, ya que la vida media extracelular e intracelular del montaje de ADN para recombinarse es demasiado corto y la eficacia de recombinación es generalmente baja. En otros organismos estas dificultades se han resuelto utilizando vectores que se duplican en el hospedador aumentando de este modo la probabilidad del episodio de recombinación. No obstante después del episodio de recombinación ha de eliminarse el vector que lleva ahora la secuencia de ADN diana intacta. Este problema se solucionó en *Lactococcus lactis* (Biswas *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1993) utilizando replicones sensibles a la temperatura que pueden eliminarse a la temperatura no permisiva. Actualmente no hay ningún vector disponible con estas características para *Clostridia*. Por consiguiente la construcción de mutantes en *Clostridia* ha sido hasta ahora muy laboriosa y con frecuencia sin éxito.

35 La inactivación de genes en *Clostridia* se publicó en los artículos siguientes (véase Tabla 1).

Tabla 1

Cepa	Genotipo	Referencia
PJC4BK de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>buk</i> ⁻ , <i>MLS</i> ^H	Green <i>et al.</i> , 1996
PJC4PTA de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>pta</i> ⁻ , <i>MLS</i> ^H	Green <i>et al.</i> , 1996
PJC4AAD de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>aad</i> ⁻ , <i>MLS</i> ^H	Green y Bennett, 1996
SM101 y F4969 de <i>Clostridium perfringens</i>	Δ <i>cpe</i> , <i>CatP</i>	Saarker <i>et al.</i> , 1999
Cepa 13 de <i>Clostridium perfringens</i>	Δ <i>luxS</i>	Ohtani <i>et al.</i> , 2002
SKO1 de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	Δ <i>spoA</i> , <i>MLS</i> ^F	Harris <i>et al.</i> , 2002
Tipo A de <i>Clostridium perfringens</i>	Δ <i>spo0A</i>	Huang <i>et al.</i> , 2004
SM101 de <i>Clostridium perfringens</i>	<i>ccpA</i> ⁻ , <i>CatP</i>	Varga <i>et al.</i> , 2004
ATCC 824 <i>buk</i> de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	Δ <i>SpolIE</i> , <i>buk</i> ⁻ , <i>CatP</i>	WO 2006/007530

40 La inactivación génica se ha realizado hasta ahora en *Clostridia* transformando con ADN circular que no podía duplicarse en las cepas diana. Ya que las ADNAsas y las endonucleasas de restricción de ADN presentes en *Clostridia* degradan rápidamente el ADN introducido, y generalmente la frecuencia de recombinación en este género no es muy elevada, ha sido muy laboriosa la obtención de mutantes.

45 Además, las cepas recombinantes descritas hasta ahora (véase anteriormente) son todas resistentes a MLS o a cloranfenicol y los correspondientes genes marcadores no pueden eliminarse después que se ha producido el episodio de recombinación. Esto limita el número de posibles recombinaciones al número de marcadores de resistencia disponibles en estas bacterias a un máximo de 3. Además, para la utilización industrial de estas bacterias, podría ser útil tener cepas sin marcadores a fin de impedir la liberación de genes con resistencia a los antibióticos en los medios de fermentación.

50 Por otra parte, algunas de estas cepas que se han obtenido por episodios de recombinación individuales adolecen el inconveniente de que no son estables si se cultivan sin presión de selección alguna.

55 Por consiguiente, todavía existe la necesidad en la situación actual de la tecnología de un procedimiento para la

transformación de *Clostridia* con gran eficacia, con una fácil etapa de selección de cepas recombinantes, que permite las sustituciones sucesivas de la secuencia de ADN en la misma cepa, conduciendo a *Clostridia* recombinantes que son genéticamente estables y sin marcadores.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para reemplazar o eliminar secuencias de ADN en *Clostridia*, fácil de realizar y aplicable a nivel industrial. Este procedimiento es útil para modificar varios locus genéticos en *Clostridia* de manera rutinaria.

Este procedimiento se basa en un vector duplicado útil para la transformación de *Clostridia* con gran eficacia.

10 Con este nuevo procedimiento, puede introducirse en el genoma un número ilimitado de mutaciones, eliminando los casetes con resistencia del genoma y reutilizándolos en sucesivas rondas de sustitución de la secuencia de ADN.

15 La introducción eficaz de múltiples mutaciones en *Clostridia* permitiría a la industria mejorar las cepas industriales existentes y desarrollar nuevos procedimientos.

Descripción de la invención

20 La presente invención proporciona un procedimiento para la sustitución de una secuencia de ADN diana mediante recombinación homóloga en *Clostridia*, que comprende:

- Transformar dicha cepa con un vector que comprende:

25 - un origen de replicación que permite su replicación en *Clostridia* y

- un casete de sustitución que comprende un primer gen marcador rodeado de dos secuencias homólogas a las regiones seleccionadas alrededor de la secuencia de ADN diana, permitiendo la recombinación del casete, y

30 - un segundo gen marcador,

- seleccionar las cepas que tienen integrada en su genoma dicho casete, que expresan el primer gen marcador,

35 - seleccionar las cepas que han eliminado dicho vector, que no expresan el segundo gen marcador,

en la que el segundo gen marcador es un marcador de contraselección.

40 Todas las técnicas de biología molecular utilizadas para realizar la invención están completamente descritas en "Molecular cloning: a laboratory manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, de Sambrook, Fritsch y Maniatis.

El término "sustitución" de una secuencia de ADN diana utilizado en el contexto de la presente invención, significa que una secuencia diferente de la original se introduce en el locus de la secuencia de ADN diana.

45 Según la invención, una secuencia de ADN se define como una secuencia génica o intergénica. Ambas pueden comprender secuencias activadoras o reguladoras.

50 La expresión "secuencia de ADN diana" significa cualquier zona génica o intergénica, secuencia activadora o reguladora de interés seleccionada por un experto en la materia. Significa en particular genes que codifican proteínas de interés, por ejemplo enzimas implicadas en el metabolismo celular.

55 La secuencia de ADN sustituida/insertada puede ser codificadora o no. Puede ser una secuencia mutada del gen diana, una secuencia activadora o reguladora y/o un marcador tal como un gen con resistencia a los antibióticos o una enzima generadora de color. Puede ser más larga o más corta que la secuencia sustituida, dependiendo de la distancia que separa las dos zonas homólogas.

60 Debido a la inserción, la expresión del gen diana está normalmente perturbada, parcial o completamente suprimida o aumentada. La sustitución de la secuencia del ADN diana por una secuencia próxima a la original, pero que comprende mutaciones, conduce a la expresión existente de una proteína, secuencia activadora o reguladora mutadas.

Si la sustitución de la secuencia de ADN diana da como resultado una eliminación total de dicha secuencia de ADN, el gen se califica como "eliminado".

65 La expresión "recombinación homóloga" se refiere al episodio de sustitución de un segmento de ADN por otro que posee zonas idénticas (homólogas) o casi idénticas. Este episodio se denomina también entrecruzamiento de ADN.

El término “transformación” se refiere a la incorporación de ácido nucleico exógeno por una célula, esta adquisición de nuevos genes que es transitoria, (si el vector que lleva los genes está curado) o permanente (en el caso de que el gen exógeno esté integrado en los cromosomas).

5 El término “vector” se refiere a un elemento extracromosómico que lleva genes o casetes, que normalmente está en forma de moléculas de ADN bicatenario circular, pero puede ser también una molécula de ADN monocatenario. Ambos términos “vector” y “plásmido” se utilizan indistintamente.

10 El vector según la invención es un vector replicante. Comprende por lo menos un origen de duplicación, y preferentemente varios orígenes duplicadores, que permiten que sea funcional en diferentes especies.

En particular un vector preferido puede comprender dos orígenes de duplicación:

- 15 - Ori, funcional en *E. coli*,
 - RepL de pLM13 procedente de *B. subtilis*, funcional en *Clostridia* (Mermelstein *et al.*, *Biotechnology*, 1992).

20 La expresión “secuencias homólogas a una secuencia de ADN diana” se refiere a las secuencias con gran similitud de secuencia con las zonas seleccionadas de la secuencia diana.

25 La expresión “gen marcador” se refiere a una secuencia que codifica una proteína marcadora bajo el control de elementos reguladores funcionales en *Clostridia*. Dichas proteínas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el experto en la materia puede utilizar un gen con resistencia a los antibióticos, un marcador fluorescente o coloreado o un marcador de auxotrofia. Se proporcionan a continuación ejemplos de genes marcadores útiles.

30 Una vez ha ocurrido el episodio de recombinación, el vector lleva ahora la secuencia de ADN diana intacta y por consiguiente debe eliminarse. La eliminación de un vector duplicador generalmente sucede con cultivos sucesivos de clones, seguida de selección negativa o positiva de clones que han eliminado este vector. La eliminación del vector puede ser también una etapa activa del proceso, con la utilización de endonucleasas que escinden específicamente las secuencias de ADN presentes en el vector. Una vez el vector está curado, las cepas no expresan ya el segundo gen marcador, y pueden seleccionarse en esta característica.

35 El segundo gen marcador es un gen marcador de contraselección.

Un marcador de contraselección es un gen cuya presencia es letal para el organismo hospedador en determinadas circunstancias, tal como la presencia de su sustrato afín. Pueden utilizarse marcadores de contraselección como una selección positiva para la pérdida del plásmido.

40 Preferentemente, el gen marcador de contraselección es un gen que restablece la actividad de un gen endógeno ausente o eliminado no esencial.

45 Los marcadores de contraselección más utilizados son los genes que proporcionan sensibilidad a la sacarosa, estreptomycinina o ácido fusárico. Se han utilizado para construir mutantes o cepas de vacuna en varias cepas bacterianas. Para detalles véase el estudio de Reytrat *et al.*, 1998, *Infection and Immunity*. Los marcadores de contraselección que pueden utilizarse en *Clostridia* incluyen genes que proporcionan sensibilidad a 5-fluoro-uracilo (5-FU), gamma-glutamil hidrazida (GBS) o 8-aza-2,6-diaminopurina (8ADP).

50 En una forma de realización preferida, el marcador de contraselección es el gen *upp*, que codifica uracil fosforribosil-transferasa que favorece la transformación de 5-fluoro-uracilo (5-FU) a un producto tóxico. Las células con actividad de *upp* no pueden desarrollarse en un medio con 5-FU.

55 La utilización de este marcador de contraselección es particularmente útil cuando las *Clostridia* transformadas son Δupp , y por consiguiente son capaces de desarrollarse en un medio que contiene 5-FU antes de la transformación y de la eliminación del vector. Las cepas que han eliminado el vector pueden seleccionarse positivamente.

60 Los mutantes supresores que pueden aparecer en el gen *upp* en presencia de 5-FU, pueden conducir a veces a falsas suposiciones con respecto a la pérdida del plásmido. En una forma de realización preferida de la invención, el vector comprende además un tercer marcador, preferentemente un gen con resistencia a los antibióticos que permite una segunda selección de cepas sensibles al antibiótico. Esta selección negativa puede utilizarse además de la selección positiva basada en el gen *upp*.

65 En una forma de realización preferida de la invención, el vector se elimina por digestión con endonucleasas una vez se ha producido el episodio de recombinación. Preferentemente, el vector alberga secuencias de ADN que son reconocidas por las endonucleasas de restricción y que están al mismo tiempo ausentes del genoma de la especie de *Clostridium* utilizada. Por consiguiente el vector se destruye específicamente sin pérdida de integridad del

genoma de *Clostridium*.

5 Las endonucleasas de restricción son enzimas que escinden las moléculas de ADN en la posición de las secuencias básicas específicas, el sitio de la endonucleasa de restricción. El experto en la materia podrá determinar qué sitio de la endonucleasa de restricción falta del genoma de la cepa de *Clostridium* de interés. Las posibles endonucleasas de restricción que pueden aplicarse para *C. acetobutylicum* son *Ascl*, *Fsel*, *NotI*, *SfiI*, *SrfI*. En otra forma de realización pueden utilizarse meganucleasas, que reconocen grandes sitios diana de ADN (12 a 45 pb) tales como I-SceI, HO o I-CreI.

10 En una forma de realización preferida la cepa de *Clostridium* que debe transformarse alberga en su genoma por lo menos un gen que codifica la endonucleasa, que reconoce el sitio de la endonucleasa de restricción que está presente en el vector. Opcionalmente, la expresión de la endonucleasa de restricción está bajo el control de un activador inducible.

15 Un activador inducible es un elemento de ADN que permite la expresión condicional de una secuencia diana al añadir el inductor correspondiente. Por ejemplo, un sistema activador inducible en *Clostridium* que es conocido por el experto en este campo está descrito en Girbal *et al.*, 2003, *Appl. Env. Microbiol.* 69:4985-8. Una vez el episodio de recombinación se ha producido, y antes de la identificación de las cepas que han eliminado el vector, puede producirse la expresión de la endonucleasa de restricción. La endonucleasa de restricción escindiría el vector presente en las *Clostridia* conduciendo a su eliminación. Opcionalmente el gen que codifica la endonucleasa de restricción puede insertarse en el genoma antes de la introducción en el vector de la cepa.

20 En otra forma de realización de la invención el gen que codifica la endonucleasa de restricción puede aumentar también la frecuencia de recombinación antes de la eliminación del plásmido al aumentar la cantidad de ADN lineal en las células que es conocido por recombinar mejor este ADN circular.

25 En una forma de realización específica de la invención, el primer gen marcador es un gen con resistencia a los antibióticos introducido en el medio del casete de sustitución.

30 En una forma de realización específica de la invención, este primer gen marcador puede eliminarse del genoma de las cepas transformadas de *Clostridium*. En particular, el primer gen marcador puede estar rodeado por dos sitios diana de recombinasa, y después eliminarse mediante la acción de una recombinasa, una vez que se ha producido el episodio de recombinación homóloga.

35 En una forma de realización ventajosa de la invención, la recombinasa es expresada por un segundo vector que lleva el gen correspondiente, introduciéndose dicho vector en las *Clostridia* por transformación.

40 Preferentemente, los sitios diana de recombinasa son secuencias FRT. La FLP recombinasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* es activa en una secuencia de ADN específica de 34 pares de bases, denominada secuencia FRT (para la FLP recombinasa diana). Cuando dos de estos sitios FRT están presentes, la enzima FLP crea roturas bicatenarias en las cadenas de ADN, intercambia los extremos de la primera FRT con los de la segunda secuencia diana, y a continuación reacopla las cadenas intercambiadas. Este proceso conduce a la eliminación del ADN que se une entre los dos sitios.

45 En una forma específica de realización de la invención, las secuencias homólogas para las zonas seleccionadas alrededor de la secuencia de ADN diana pueden comprender mutaciones en hasta el 10% de los pares de bases que componen el fragmento de ADN utilizado para el episodio de recombinación.

50 En una forma de realización ventajosa de la invención, las cepas de *Clostridium* que deben transformarse se eliminan de los genes que codifican las endonucleasas de restricción. Estas cepas presentan la ventaja de que se pueden transformar fácilmente sin ninguna metilación previa del plásmido *in vivo*.

55 En otra forma de realización ventajosa de la invención, las cepas de *Clostridium* que deben transformarse se eliminan de los genes que codifican las ADNasas extracelulares.

En otra forma de realización de la invención, los *Clostridia* que deben transformarse son eliminadas por gen *upp*.

60 En otra forma de realización ventajosa de la invención, las cepas de *Clostridium* que deben transformarse se seleccionan de entre *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium saccharolyticum* (actualmente *Thermoanaerobacter saccharolyticum*), *Clostridium thermosulfurogenes* (actualmente *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (actualmente *Thermoanaerobacter ethanolicus*).

65 La cepa de *Clostridium* preferida es *Clostridium acetobutylicum*.

En una forma de realización preferida de la invención, la cepa *Clostridium acetobutylicum* que debe transformarse es una cepa Δ Cac15, eliminada por el gen que codifica la endonucleasa de restricción Cac 824I. Esta cepa presenta la ventaja de que se puede transformar fácilmente sin ninguna manipulación del plásmido previa *in vivo*.

5 En otra forma de realización preferida de la invención, la cepa de *Clostridium acetobutylicum* que debe transformarse es una cepa cuyo gen *upp* se eliminó, denominada Δ upp. Como consecuencia la transformación de la cepa con un vector que lleva el gen *upp* permite la selección de cepas sensibles al medio con 5-FU, y a continuación la selección positiva de cepas que han perdido el plásmido que no son sensibles ya al medio con 5-FU.

10 La cepa de *Clostridium acetobutylicum* que debe transformarse puede también ser Δ Cac15 Δ upp.

El procedimiento se utiliza con ventaja para la sustitución sucesiva de dos o más genes diana por recombinación homóloga en la misma cepa de *Clostridium*.

15 La presente invención se refiere también al vector para transformar la cepa, tal como se describió anteriormente.

Descripción de los dibujos

20 Figura 1: Cartografía del vector pUC18-FRT-MLS2

Figura 2: Cartografía del vector pCons2-1

Figura 3: Cartografía del vector pCIP2-1

25 Figura 4: Cartografía del vector pCons::UPP

Figura 5: Cartografía del vector pCLF1

30 Figura 6: Representación esquemática del procedimiento de eliminación para *Clostridia*.

Las etapas siguientes se llevan a cabo sucesivamente:

- A- Ampliación de dos zonas seleccionadas alrededor de la secuencia de ADN diana; 1, 2, 3, 4 representan cebadores para RCP
- 35 B- Clonación de los fragmentos de RCP obtenidos en el vector de clonación pTOPO
- C- Inserción de un marcador en el sitio de restricción *StuI*, presente en los cebadores de RCP
- D- Clonación del casete de sustitución en el sitio *Bam*HI de pCONS 2.1: construcción del vector pREP clo Y
- E- Transformación de *Clostridium* con el vector pREP clo Y
- F- Integración cromosómica del casete de sustitución por doble entrecruzamiento durante el subcultivo
- 40 G- Identificación de los clones con fenotipos de Ery^R y Thiam^S
- H- Análisis de RCP para comprobar la sustitución del gen y la pérdida del plásmido OR
- D'- Clonación del casete de sustitución en el sitio *Bam*HI de pCONS::UPP : Construcción del vector pREP clo Y:UPP
- E'- Transformación de Δ upp de *Clostridium* con el vector pREP clo Y:UPP
- F'- Integración cromosómica del casete de sustitución por doble entrecruzamiento durante el subcultivo
- 45 G'- Identificación de los clones con fenotipos Ery^R y 5-FU^R (Thiam^S)
- H'- Análisis por RCP para comprobar la sustitución génica y la pérdida de plásmidos.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: construcción de vectores

1.1 Construcción de pUC18-FRT-MLS2

Este plásmido contiene un gen MLS^r funcional en *Clostridia* y flanqueado por dos sitios FRT y dos sitios *StuI* y sirve para la construcción de los casetes de sustitución. Se realizó la reacción en cadena de polimerasa inversa (RCPI) con Pwo ADN polimerasa con pKD4 como plásmido plantilla (Datsenko y Wanner, 2000) y los oligonucleótidos PKD4.1 y PKD4.2 como cebadores para ampliar la zona del plásmido con los sitios FRT pero sin el marcador Km^r. Este fragmento con extremo truncado se ligó después al gen MLS^r obtenido después de una digestión con *Hind*III del plásmido pETSPO (Harris *et al.*, 2002, *J. Bacteriol.*) y tratamiento de Klenow. El plásmido correspondiente (pKD4-Ery1) se utilizó después como plantilla para ampliar el gen MLS^r en una reacción de RCP utilizando los oligonucleótidos FRT-MLSR-F y FRT-MLSR-R como cebadores y Pwo ADN polimerasa. Este fragmento se clonó directamente en pUC18 digerido con *Sma*I para dar el plásmido pUC18-FRT-MLS2 (figura 1).

Cebadores para PCR:

PKD4.1 (SEC ID n°1):	5'-ctggcgccctgagtgcttgcggcagcgtgagggg-3'
PKD4.2 (SEC ID n°2):	5'-agcccggggatctcatgctggagttcttcgccc-3'
FRT-MLSR-F (SEC ID n°3):	5'-tacaggccttgagcgttgtaggctggagc-3'
FRT-MLSR-R (SEC ID n°4):	5'-aacaggcctgggatgtaacgcactgagaagccc-3'

1.2 Construcción de pCons 2.1

5 Este plásmido contiene un origen de replicación de pIM funcional en *Clostridia* (mecanismo de círculo rodante de la replicación), un gen *catP* que proporciona resistencia a tianfenicol y un único sitio *Bam*HI para la clonación del casete de sustitución. Este plásmido se construyó en un procedimiento de dos etapas a partir del plásmido pETSPO (Harris *et al.*, 2002, *J. Bacteriol.*) para eliminar parte de un polienlazador y entre otros un sitio *Bam*HI y un sitio *Eco*RI. La RCPI se realizó con Pwo ADN polimerasa con pETSPO como plásmido plantilla y los oligonucleótidos PCONSAccl y PCONSEcoRI como cebadores, y el producto de la RCP se fosforiló y se ligó. Después de la transformación de *E. coli* se obtuvo el plásmido pCons0. Este plásmido se digirió a continuación con *Bam*HI para eliminar el casete *spo0A*, el fragmento de ADN adecuado purificado y ligado para dar el plásmido pCons2-1. La cartografía de pCons2-1 se da en la figura 2.

Cebadores de RCP:

ONSAccl (SEC ID n°5) :	5'-ccggggtaccgtcgacctgcagcc -3'
PCONSEcoRI (SEC ID n°6) :	5'-gaattccgagctcggtaccggc -3'

1.3 Construcción del vector pCIP 2-1

20 En este montaje el origen de replicación de pIM13 de pCons2-1 se sustituyó por el origen de duplicación del plásmido pSOL1, un plásmido que tiene un mecanismo θ de replicación. Con este fin el origen de replicación de pSOL1 se amplió por RCP con Pwo ADN polimerasa utilizando ADN completo de *C. acetobutylicum* como plantilla y oligonucleótidos ori-3-D y ori-4-R como cebadores. El producto de la RCP se clonó en el pCR-BluntII-TOPO y el plásmido resultante fue digerido por *Eco*RI y el fragmento de 2,2 kb se purificó. De manera similar, el plásmido pCons 2.1 fue digerido por *Eco*RI y el fragmento de 2,4 kb se purificó y se ligó al fragmento *Eco*RI de 2,2 kb que contiene el origen de replicación de pSOL1 para dar el plásmido pCIP2-1 (Figura 3).

Cebadores de RCP

ORI-3-D (SEC ID n°7) :	5'-ccatcgatgggggtcatgcatcaatactatcccc-3'
ORI-4-R (SEC ID n°8) :	5'-gcttccctgttttaatacctttcgg-3'

1.4 Construcción del vector pCons::upp

35 El gen *upp* con su propio sitio de unión al ribosoma (rbs) se clonó en pCons2.1 en el sitio *Bcgl* justo corriente abajo del gen *CatP* para construir un operón artificial con *upp* expresado bajo el control del activador *CatP*. De este modo, no se introdujeron regiones homólogas que podrían permitir la integración cromosómica del gen *upp* en la cepa Δ *cac15* Δ *upp* en experimentos de eliminación adicionales, que utilizan el gen *upp* como marcador de contraselección para la pérdida del plásmido.

40 El gen *upp* con su rbs se amplió por RCP (Pfu) en el ADN genómico de *C. acetobutylicum* utilizando los oligonucleótidos REP-UPP F y REP-UPP R como cebadores. El producto de la RCP de 664 pb fue digerido por PvuII y se clonó en pCons 2.1 digerido por *Bcgl* y tratado con T4 ADN polimerasa para trincar los extremos. De este modo se obtuvo el vector duplicador pCons::UPP (véase la figura 4).

Cebadores de RCP

REP-UPP F (SECID n°9) :	5'-aaaacagctgggaggaatgaaataatgagtaaagttacac-3'
REP-UPP R (SEC ID n°10) :	5'-aaaacagctgttattttgtaccgaataatctatctccagc-3'

1.5 Construcción del vector pCLF1

50 El gen *FLP1* de *S. cerevisiae* que codifica la FLP recombinasa se clonó en el vector pCons 2.1 bajo el control del activador y RBS procedente del gen de la tiolasa (*thl*) procedente de *C. acetobutylicum* que permite gran expresión en este organismo.

55 El gen *FLP1* se amplió por RCP (Pfu) utilizando los oligonucleótidos FLP1-D y FLP1-R como cebadores y el plásmido pCP20 (Datsenko y Wanner, 2000) como plantilla.

Cebadores de RCP

- 5 - FLP1-D (SEC ID nº11) : 5'-aaaaggatccaaaaggaggattaaaatgccacaatttggtatattatgtaaaacaccacct-3'
 - FLP1-R (SEC ID nº12) : 5'-aaatggcgccgcgtacttatatgctgctctattatgtaggatgaaaggta-3'

FLP1-D tiene una extensión en 5' que incluye un sitio *Bam*HI y la secuencia por RBS de *thl*.

FLP1-R introdujo un sitio *Sfo*I en 3' del producto de la RCP.

10 El producto de la RCP fue digerido por *Bam*HI y *Sfo*I y se clonó directamente en el vector de expresión pSOS95 que había sido digerida con las mismas enzimas, dando el plásmido **pEX-FLP1** (6281 pb).

15 El fragmento *Sa*II (1585 pb) de pEX-FLP1 que contiene el casete de expresión FLP1 se clonó en el sitio *Sa*II de pCONS2.1 para obtener el plásmido pCLF1 (4878 pb) (figura 5).

Ejemplo 2: *Eliminación del gen cac1502 que codifica la enzima de restricción cac8241 en Clostridium acetobutylicum*

20 Para una representación esquemática del procedimiento véase la figura 6.

Dos fragmentos de ADN que rodean el gen que codifica a *Cac8241* (*CAC1502*) se ampliaron por RCP con Pwo ADN polimerasa utilizando ADN completo procedente de *C. acetometilycum* como plantilla y dos pares específicos de oligonucleótidos como cebadores (véase la tabla 2). Utilizando pares de cebadores CAC 1B-CAC 2 y CAC 3-CAC 4B, se obtuvieron fragmentos de ADN de 1493 pb y 999 pb, respectivamente. Ambos cebadores CAC 1B y CAC 4B introducen un sitio *Bam*HI mientras que los cebadores CAC 2 y CAC 3 tienen secuencias complementarias prolongadas por 5' que introducen un sitio *Stu*I. Los fragmentos de ADN CAC 1B-CAC 2 y CAC 3-CAC 4B se unieron en un experimento de fusión por RCP con los cebadores CAC 1B y CAC 4B y el fragmento resultante se clonó en el vector pCR4-TOPO-truncado para dar pTOPO:cac15. En el único sitio *Stu*I del pTOPO:cac15, se introdujo el fragmento *Stu*I de 1372 pb de pUC18-FRT-MLS2 que alberga el gen *MLS^r* con resistencia a los antibióticos con las secuencias FRT en ambos lados. El casete de sustitución *cac1502* obtenido tras la digestión con *Bam*HI del plásmido resultante se clonó, en la *Bam*HI, en el sitio pCons2-1 para dar el plásmido pREPCAC15 y en pCIP2.1 para dar pCIPCAC15.

35 Los plásmidos pREPCAC15 y pCIPCAC15 se metilaron *in vivo* y se utilizaron para transformar *C. acetobutylicum* por electroporación. Después de la sección en placas de Petri para clones resistentes a eritromicina (40 µg/ml), se cultivó una colonia de cada uno de los transformantes durante 24 horas en medio sintético líquido con eritromicina a razón de 40 µg/ml y a continuación se subcultivó en medio 2YTG líquido sin antibiótico. Se colocaron diluciones apropiadas en placas en agar-agar con *Clostridium* reforzado (ACR) con eritromicina a razón de 40 µg/ml. Para seleccionar integrantes que han perdido los vectores pREPCAC15 o pCIPCAC15, los clones resistentes a eritromicina se colocaron réplicas tanto en ACR con eritromicina a razón de 40 µg/ml y ACR con tianfenicol a razón de 50 µg/ml. Aunque con los transformantes de pREPCAC15 se obtuvieron varias colonias con el fenotipo deseado, con los transformantes de pCIPCAC15 no se obtuvieron ninguna de dichas colonias. Esto demuestra que el mecanismo θ de replicación de pCIPCAC15 es menos favorable para favorecer el doble entrecruzamiento en *C. acetobutylicum* que un mecanismo de de círculo rodante. El genotipo de los clones resistentes a la eritromicina y sensible a tianfenicol se comprobado por análisis de RCP (con los cebadores CAC 0 y CAC 5 situados fuera del casete de sustitución CAC15 y los cebadores CAC D y CAC R situado dentro de *cac1502*). Se aislaron las cepas $\Delta cac15::mIs^R$ que han perdido pREPCAC15.

50 Se transformó una cepa $\Delta cac15::mIs^R$ con el vector pCLF1 que expresa el gen *FLP1* que codifica la Flp recombinasa de *S. cerevisiae*. Después de la transformación y selección para resistencia al tianfenicol (50 µg/ml) en placas de Petri, se cultivó una colonia en medio líquido sintético con tianfenicol a razón de 50 µg/ml y diluciones apropiadas se colocaron en placas en ACR con tianfenicol a razón de 50 µg/ml. Los clones resistentes a tianfenicol eran réplicas colocadas en placa tanto en ACR con eritromicina a razón de 40 µg/ml como ACR con tianfenicol a razón de 50 µg/ml. El genotipo de clones con sensibilidad a la eritromicina y resistencia al tianfenicol se comprobó por análisis RCP con los cebadores CAC 0 y CAC 5B.

60 Dos cultivos sucesivos de 24 horas de la cepa $\Delta cac15$ con sensibilidad a eritromicina y resistencia al tianfenicol se realizaron para perder pCLF1. La cepa $\Delta cac15$ que ha perdido pCLF1 se aisló según su sensibilidad tanto a eritromicina como a tianfenicol. La cepa se denominó MCG $\Delta cac15$ de *C. acetobutylicum*.

Tabla 2

Denominación	SEC ID nº	Secuencias de cebador
CAC 1B	13	aaaggatccatgcacactcataaatttactgtaggaagtctg'
CAC 2	14	ggggaggcctaaaaggggggtcccaataatattgcatagtaaccacc
CAC 3	15	cccccttttaggcctcccctcgaactattagaatgattaagattccgg
CAC 4B	16	aaaggatccctcattaaatttctccattttaagcctgtc
CAC 0	17	gtgatataatttctttaaattggaggaggatctg
CAC 5B	18	gccgtaatagacattataattccattggc
CAC D	19	gaattcttaaaaaatttggatcattaagcgg
CAC R	20	gttgattggaatcttggattatttctccc

Ejemplo 3: Eliminación del gen *upp* que codifica la uracil fosforribosil-transferasa en $\Delta cac15$ de *Clostridium acetobutylicum*

Se ampliaron por PCR dos fragmentos de ADN corriente arriba y corriente abajo de *upp* (CAC2879) con Pwo ADN polimerasa utilizando ADN completo de *C. acetobutylicum* como plantilla y dos pares específicos de oligonucleótidos como cebadores (véase la tabla 3). Con los pares de cebador UPP 1-UPP 2 y UPP 3-UPP 4, se obtuvieron los fragmentos de ADN de 1103 pb y 1105 pb, respectivamente. Ambos cebadores UPP 1 y UPP 4 introducen un sitio *Bam*HI, mientras que los cebadores UPP 2 y UPP 3 han ampliado en 5' las secuencias que introducen un sitio *Stu*I. Los fragmentos de ADN UPP 1-UPP 2 y UPP 3-UPP 4 se unieron en un experimento de fusión por RCP con los cebadores UPP 1 y UPP 4 y el fragmento resultante se clonó en pCR4-TOPO-truncado para dar pTOPO:*upp*. En el único sitio *Stu*I de pTOPO:*upp*, se introdujo el fragmento *Stu*I de 1372 pb de pUC18-FRT-MLS2 que alberga el gen *MLS^r* con resistencia a los antibióticos con la secuencia FRT en ambos lados. El casete de sustitución *upp* obtenido después de la digestión con *Bam*HI del plásmido resultante se clonó en pCons2-1 en el sitio *Pam*HI para dar el plásmido pREPUPP.

El plásmido pREPUPP se utilizó para transformar la cepa MGC $\Delta cac15$ de *C. acetobutylicum* por electroporación sin metilación previa *in vivo*. Tras la selección en placas de Petri para la selección de los clones resistentes a eritromicina (40 μ g/ml), se cultivó una colonia durante 24 horas en medio sintético líquido con eritromicina a razón de 40 μ g/ml y a continuación se subcultivó en medio 2YTG líquido sin antibiótico. Se colocaron en placas diluciones apropiadas en RCA con eritromicina a razón de 40 μ g/ml. Los integrantes seleccionados que han perdido el vector pREPUPP, clones resistentes a eritromicina se colocaron por duplicado en placas en ambos ACR con eritromicina a razón de 40 μ g/ml y ACR con tianfenicol a razón de 50 μ g/ml. El genotipo de los clones resistentes a la eritromicina y sensibles a tianfenicol se comprobó por análisis de RCP (con los cebadores UPP 0 y UPP 5 situados fuera del casete UPP de sustitución y los cebadores UPP D y UPP R situados dentro de UPP). Se aisló la cepa $\Delta cac15\Delta upp::mils^r$ que ha perdido pREPUPP. Se confirmó la eliminación de *cac1502* previa como se describió anteriormente en el primer ejemplo. La cepa $\Delta cac15\Delta upp::mils^r$ es resistente a 5-FU 400 UM comparada con 50 μ M para la cepa $\Delta cac15$.

La cepa $\Delta cac15\Delta upp::mils^r$ se transformó con el vector pCLF1 que expresa el gen *FLP1* que codifica la Flp recombinasa de *S. cerevisiae*. Después de la transformación y selección por resistencia a tianfenicol (50 μ g/ml) en placas de Petri, se cultivó una colonia en medio líquido sintético con tianfenicol a razón de 50 μ g/ml y diluciones apropiadas se colocaron en ACR con tianfenicol a razón de 50 μ g/ml. Los clones resistentes a tianfenicol se colocaron por duplicado en placa tanto en ACR con eritromicina a razón de 40 μ g/ml como ACR con tianfenicol a razón de 50 μ g/ml. El genotipo de los clones con sensibilidad a la eritromicina y resistencia a tianfenicol se comprobó por análisis RCP con los cebadores UPP 0 y UPP 5. Dos cultivos de 24 horas sucesivos de la cepa $\Delta cac15\Delta upp$ con sensibilidad a la eritromicina y resistencia al tianfenicol se realizaron para perder pCLF1. La cepa $\Delta cac15\Delta upp$ que ha perdido pCLF1 se aisló determinando su sensibilidad tanto a eritromicina como a tianfenicol.

Tabla 3

Denominación	SEC ID nº	Secuencias de cebadores
UPP 1	21	aaaaggatcctctgatctattaattcttgatgaacc
UPP 2	22	ggggaggcctaaaagggggattgcataaataaaagggctgaaaataaatttcag
UPP 3	23	cccccttttaggcctccccttattcattcctcattgtattttttctattg
UPP 4	24	aaaaggatccgctattatgaatagggttaataagtcagctgg
UPP 0	25	aatacaagcaaagagaataggctatgtgcc
UPP 5	26	aatacaagcaaagagaataggctatgtgcc
UPP D	27	ggcatatgaagtaacaagagaatgcagc
UPP R	28	ataatctatctccagcatctccaagacc

Ejemplo 4: Eliminación del gen *cac3535* con utilización de *upp* y 5-fluorouracilo como selección positiva para la pérdida del plásmido

Dos fragmentos de ADN corriente arriba y corriente abajo de *cac3535* que codifica un segundo sistema de modificación por restricción de *C. acetobutylicum* se ampliaron por PCR con Pwo ADN polimerasa utilizando ADN completo de *C. acetobutylicum* como plantilla y dos pares específicos de oligonucleótidos (véase la tabla 4). Con los pares de cebador RM 1-RM 2 y RM 3-RM 4, se obtuvieron fragmentos de ADN de 1 kpb y 0,9 kpb, respectivamente. Ambos cebadores RM 1 y RM 4 introducen un sitio *Bam*HI, mientras que los cebadores RM 2 y RM 3 tienen secuencias complementarias ampliadas en 5' que introducen un sitio *Stu*I. Los fragmentos de ADN RM 1-RM 2 y RM 3-RM 4 se unieron en un experimento de fusión por RCP utilizando cebadores RM 1 y RM 4 y el fragmento resultante se clonó en el vector pCR4-TOPO-truncado para dar el plásmido pTOPO:*cac3535*. En el único sitio *Stu*I de pTOPO:*cac3535*, se introdujo el fragmento *Stu*I de 1372 pb de pUC18-FRT-MLS2 que alberga el gen MLS^r con resistencia a antibiótico con las secuencias FRT en ambos lados. El casete de CAC 3535 sustitución *upp* obtenido después de la digestión con *Bam*HI del plásmido resultante se clonó en pCons2::*upp* en el sitio *Bam*HI para dar el plásmido pREPCA3535::*upp*.

El plásmido pREPCA3535::*upp* se utilizó para transformar la cepa MGCΔ*cac15*Δ*upp* de *C. acetobutylicum* por electroporación. Tras la selección en placas de Petri para la selección de los clones resistentes a eritromicina (40 μg/ml), se cultivó una colonia durante 24 horas en medio sintético líquido con eritromicina a razón de 40 μg/ml y 100 μl de cultivo sin diluir se colocaron en RCA con eritromicina a razón de 40 μg/ml y 5-FU a 400 μM. Las colonias resistentes tanto a eritromicina como a 5-FU se colocaron por duplicado en placas en ambos ACR con eritromicina a razón de 40 μg/ml y ACR con tianfenicol a razón de 50 μg/ml para verificar que la resistencia a 5-FU está asociada a la sensibilidad con tianfenicol. El genotipo de los clones resistentes a la eritromicina y sensibles a tianfenicol se comprobó por análisis de RCP (con los cebadores RM 0 y RM 5 situados fuera del casete *cac3535* de sustitución y los cebadores RM D y RM R situados dentro del gen *cac3535*). De esta manera, se aisló la cepa Δ*cac15*Δ*upp*Δ*cac35*::*mls*^r que ha perdido pREPCA3535::*upp*.

Tabla 4

Denominación	SEC ID nº	Secuencias de cebadores
RM 1	29	aaaaggatccgcagcttctggaaggactacggcg
RM 2	30	ggggaggcctaaaagggggcattactatggtacgggtcacc
RM 3	31	cccccttttaggcctccccgtcttataaaaagtaattatcaaggcatcaaggc
RM 4	32	cccccttttaggcctccccgtcttataaaaagtaattatcaaggcatcaaggc
RM 0	33	cacattgtcattataaaaagtcctaggg
RM 5	34	gtagtaattccaactcaactcttgccac
RM D	35	cttagaatagctgatattgcttgcgg
RM R	36	agcatctcttaatgattctccgg

Referencias

Bennett GN, Scotcher MC

BLOCKING SPORULATION BY INHIBITING SPOIIE

WO2006007530 published on 2006-01-19
Applicant: RICE UNIVERSITY (US)

Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for grampositive bacteria. J Bacteriol. 1993 Jun;175(11):3628-35.

Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6640-5

Fabret C, Ehrlich SD, Noirot P. A new mutation delivery system for genome-scale approaches in Bacillus subtilis. Mol Microbiol. 2002 Oct;46(1):25-36

Girbal L, Mortier-Barriere I, Raynaud F, Rouanet C, Croux C, Soucaille P. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for Clostridium acetobutylicum. Appl Environ Microbiol. 2003 Aug;69(8):4985-8.

Green EM, Bennett GN. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Appl Biochem Biotechnol. 1996 Spring;57-58:213-21.

Green EM, Boynton ZL, Harris LM, Rudolph FB, Papoutsakis ET, Bennett GN. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Microbiology. 1996 Aug;142 (Pt 8):2079-86.

Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in Clostridium acetobutylicum ATCC 824. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3586-97.

Huang IH, Waters M, Grau RR, Sarker MR. Disruption of the gene (spo0A) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. FEMS Microbiol Lett. 2004 Apr 15;233(2):233-40.

5 Mermelstein LD, Welker NE, Bennett GN, Papoutsakis ET. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Biotechnology (N Y). 1992 Feb;10(2):190-5.

10 Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol. 2002 Apr;44(1):171-9.

Reyrat JM, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. Infect Immun. 1998 Sep;66(9):4011-7. Review.

15 Sarker MR, Carman RJ, McClane BA. Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. Mol Microbiol. 1999 Sep;33(5):946-58. Erratum in: Mol Microbiol 2000 Jan;35(1):249.

20 Varga J, Stirewalt VL, Melville SB. The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (cpe) regulation in *Clostridium perfringens*. J Bacteriol. 2004 Aug;186(16):5221-9.

WO 01/71040 - Dupont de Nemours

Method for determination of gene function International publication date : 27 September 2001

25

Listado de secuencias

<110> METABOLIC EXPLORER

30 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA INTEGRACIÓN CROMOSÓMICA Y SUSTITUCIÓN DE SECUENCIA DE ADN EN CLOSTRIDIA

<130> 66946 D24607

35 <150> PCT/EP2006/066997<151> 2006-10-03

<160> 36

<170> Patente en version 3.3

40

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> cebador RCP

<400> 1

50

ctggcgccct gactgcttgc ggcagcgtga gggg

34

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

55

<213> Artificial

<220>

<223> cebador RCP

60

<400> 2

agcccgggga tctcatgctg gacttctcg ccc

33

<210> 3

<211> 32

65

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> cebador RCP

5 <400> 3
 tacaggcctt gagcgattgt gtaggctgga gc 32

<210> 4
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador RCP

15 <400> 4
 aacaggcctg ggatgtaacg cactgagaag ccc 33

<210> 5
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador RCP

25 <400> 5
 ccgggggtacc gtcgacctgc agcc 24

<210> 6
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador RCP

<400> 6
 40 gaattccgcg agctcggtagc ccggc 25

<210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador RCP

<400> 7
 50 ccatcgatgg gggatcatgca tcaatactat cccc 34

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador RCP

<400> 8
 60 gcttccctgt ttaataacct ttcgg 25

<210> 9
 <211> 40
 65 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220> <223> cebador RCP	
5	<400> 9 aaaacagctg ggaggaatga aataatgagt aaagttacac	40
10	<210> 10 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 10 aaaacagctg ttatttgta ccgaataatc tatctccagc	40
20	<210> 11 <211> 62 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador RCP	
30	<400> 11 aaaagatcc aaaaggaggg attaaaatgc cacaattgg tatattatgt aaaacaccac ct	60 62
35	<210> 12 <211> 49 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 12 aatggcgcc gcgtactat atgcgtctat ttatgtagga tgaaggta	49
45	<210> 13 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 13 aaagatcca tgcacactca taaattfact gtaggaagtc tg	42
55	<210> 14 <211> 51 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 14 ggggaggcct aaaaaggggg gtcccaaata atattgcca tagtaaccac c	51
65	<210> 15 <211> 50 <212> ADN	

ES 2 369 859 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador RCP	
5	<400> 15 ccccctttt aggcctccc tcgaacttat tagaatgatt aagattccgg	50
	<210> 16	
10	<211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador RCP	
	<400> 16 aaaggatcct cattaaattt cctccatttt aagcctgtc	39
20	<210> 17 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador RCP	
	<400> 17 gtgatataat ttcctttaa atggaggagg atctg	35
30	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador RCP	
	<400> 18 gccgtaata gacattataa ttccattggc	30
40	<210> 19 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador RCP	
50	<400> 19 gaattcttaa aaatattgg atcattaagc gg	32
	<210> 20	
55	<211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
60	<223> cebador RCP	
	<400> 20 gttgattgg aatctttgtt attattctc cc	32
65	<210> 21 <211> 38 <212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador RCP	
5	<400> 21 aaaaggatcc tctgatcta ttaattcttg atgaacc	38
	<210> 22	
10	<211> 57 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador RCP	
	<400> 22 ggggaggcct aaaaaggggg attgcataaa taaaagggc tgaaaaataa atttcag	57
20	<210> 23 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador RCP	
	<400> 23 ccccctttt aggctcccc ttattcatt cctccattgt attttttc tatttg	56
30	<210> 24 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador RCP	
40	<400> 24 aaaaggatcc gctattatga ataggtaaa taagtcagct gg	42
	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador RCP	
50	<400> 25 aatacaagca aagagaatag gctatgtgcc	30
	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador RCP	
60	<400> 26 aatacaagca aagagaatag gctatgtgcc	30
	<210> 27 <211> 29 <212> ADN	
65		

ES 2 369 859 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador RCP	
5	<400> 27 ggcatatgaa gtaacaagag aaatgcagc	29
	<210> 28	
10	<211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador RCP	
	<400> 28 ataatctatc tccagcatct ccaagacc	28
20	<210> 29 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 29 aaaaggatcc gcagctttct ggaaggacta cggcgc	35
30	<210> 30 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 30 ggggaggcct aaaaaggggg cattactta tggtagcgtt cacccc	46
40	<210> 31 <211> 55 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador RCP	
	<400> 31 cccctttt aggctcccc gtcttaaaa agtaattat caaaggcatc aaggc	55
50	<210> 32 <211> 55 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador RCP	
60	<400> 32 cccctttt aggctcccc gtcttaaaa agtaattat caaaggcatc aaggc	55
65	<210> 33 <211> 29 <212> ADN	

ES 2 369 859 T3

<213> Artificial
<220>
<223> cebador RCP
5
<400> 33
cacattgtca ttataaaag tcctaggg 29
<210> 34
10 <211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> cebador RCP
<400> 34
gtagtaattc caactcaac tctgccac 29
<210> 35
20 <211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> cebador RCP
<400> 35
30 cttagaatag ctgatattgc ttgcgg 26
<210> 36
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> cebador RCP
<400> 36
40 agcatctctc ttaatgattc tccgg 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la sustitución de una secuencia de ADN diana mediante recombinación homóloga en *Clostridia*, que comprende:
- transformar dicha cepa con un vector que comprende:
 - un origen de replicación que permite su replicación en *Clostridia* y
 - 10 - un casete de sustitución que comprende un primer gen marcador rodeado de dos secuencias homólogas a las regiones seleccionadas alrededor de la secuencia de ADN diana, permitiendo la recombinación del casete, y
 - un segundo gen marcador,
 - 15 - seleccionar las cepas que tienen integrado en su genoma dicho casete, que expresan el primer gen marcador,
 - seleccionar las cepas que han eliminado dicho vector, que no expresan el segundo gen marcador,
- 20 en el que el segundo gen marcador es un marcador de contraselección.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el marcador de contraselección es un gen que restablece la actividad de un gen ausente o eliminado no esencial.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el marcador de contraselección es el gen *upp*.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector comprende un tercer marcador que permite una selección negativa de cepas que han eliminado dicho vector.
- 30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vector se elimina por digestión con endonucleasas.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el vector contiene secuencias de ADN que son reconocidas por endonucleasas de restricción y que están al mismo tiempo ausentes del genoma de la cepa de *Clostridium* utilizada.
- 35 7. Procedimiento según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que la cepa de *Clostridium* utilizada contiene en su genoma por lo menos una endonucleasa, específica para los sitios de restricción presentes en el vector, opcionalmente expresada bajo el control de un activador inducible.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el gen marcador es un gen con resistencia a los antibióticos.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer gen marcador está rodeado por dos sitios diana de recombinasa.
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el primer gen marcador se elimina por la acción de una recombinasa una vez se ha producido el episodio de recombinación homóloga.
- 50 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que dicha recombinasa es expresada por un gen transportado por un segundo vector introducido en la cepa.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dichos sitios diana de recombinasa son secuencias FRT, y dicha recombinasa es la FLP recombinasa.
- 55 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dichas secuencias homólogas a regiones alrededor de la secuencia de ADN diana comprenden mutaciones hasta en el 10% de los pares de bases utilizados en el episodio de recombinación.
- 60 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las *Clostridia* que van a transformarse son eliminadas por genes que codifican la endonucleasa de restricción y/o por genes que codifican la ADNasa.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las *Clostridia* que van a transformarse son eliminadas por el gen *upp*.
- 65 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que las cepas de *Clostridia* se seleccionan

de entre *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium bejeirincii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium saccharolyticum* (actualmente, *Thermoanaerobacter saccharolyticum*), *Clostridium thermosulfurogenes* (actualmente, *Thermoanaerobacter thermosulfurogenes*), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (actualmente *Thermoanaerobacter ethanolicus*).

- 5
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la cepa de *Clostridium* es *Clostridium acetobutylicum* y la cepa es Δ cac15 y/o Δ upp.
- 10
18. Procedimiento para sustitución de dos o más genes diana por recombinación homóloga en una misma cepa de *Clostridium*, en el que el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 se lleva a cabo sucesivamente dos o más veces.
- 15
19. Vector de transformación para la sustitución de una secuencia de ADN diana por recombinación homóloga en *Clostridia*, que comprende:
- un origen de replicación que permite su replicación en *Clostridia*, y
 - un casete de sustitución que comprende un primer gen marcador rodeado por dos secuencias homólogas a las regiones seleccionadas alrededor de la secuencia de ADN diana, permitiendo la recombinación del casete, y
 - un segundo gen marcador,
- 20
- en el que el segundo gen marcador es un marcador de contraselección.
- 25
20. Vector según la reivindicación 19, en el que el marcador de contraselección es un gen que restablece la actividad de un gen ausente o eliminado no esencial.
- 30
21. Vector según la reivindicación 20, en el que el marcador de contraselección es el gen *upp*.
- 35
22. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el vector comprende un tercer marcador que permite una selección negativa de cepas que han eliminado dicho vector.
- 40
23. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el vector alberga secuencias de ADN que son reconocidas por endonucleasas de restricción y que al mismo tiempo están ausentes del genoma de la cepa de *Clostridium* utilizada.
- 45
24. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el primer gen marcador es un gen con resistencia a los antibióticos.
25. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que el primer gen marcador está rodeado por dos sitios diana de recombinasa.
26. Vector según la reivindicación 25, en el que dichos sitios diana de recombinasa son secuencias FRT, y dicha recombinasa es la FLP recombinasa.

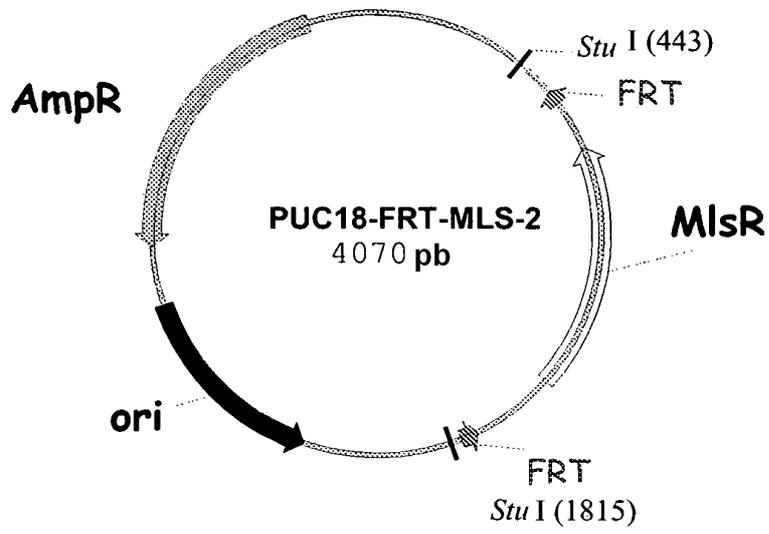


Figura 1

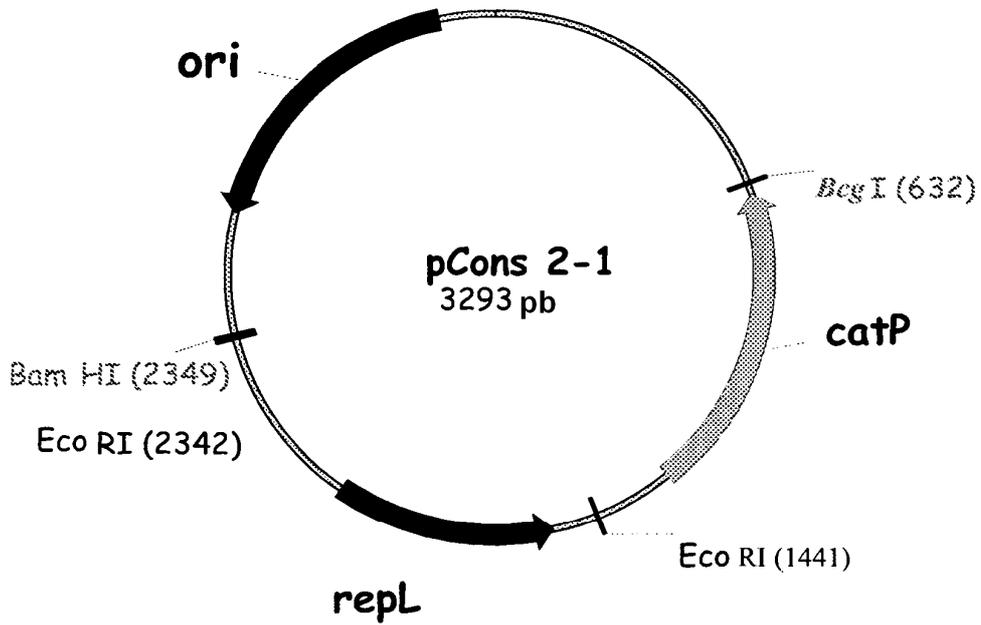


Figura 2

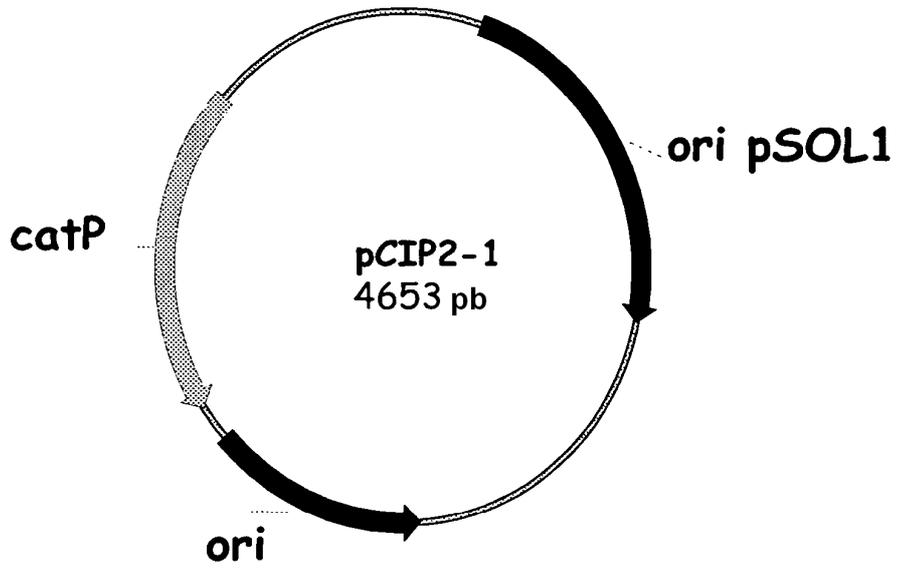


Figura 3

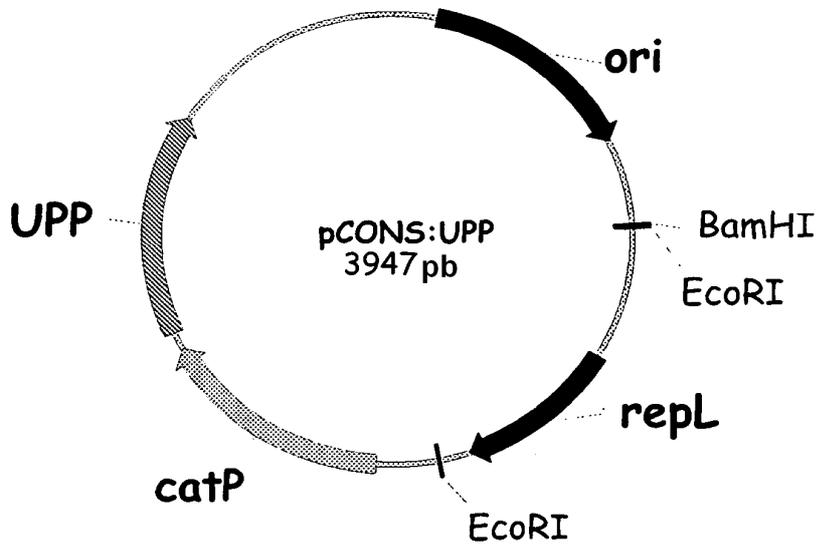


Figura 4

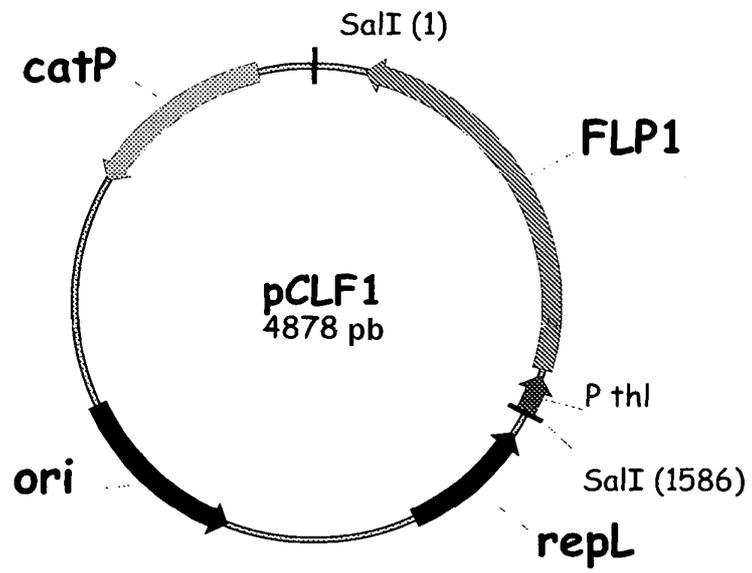


Figura 5

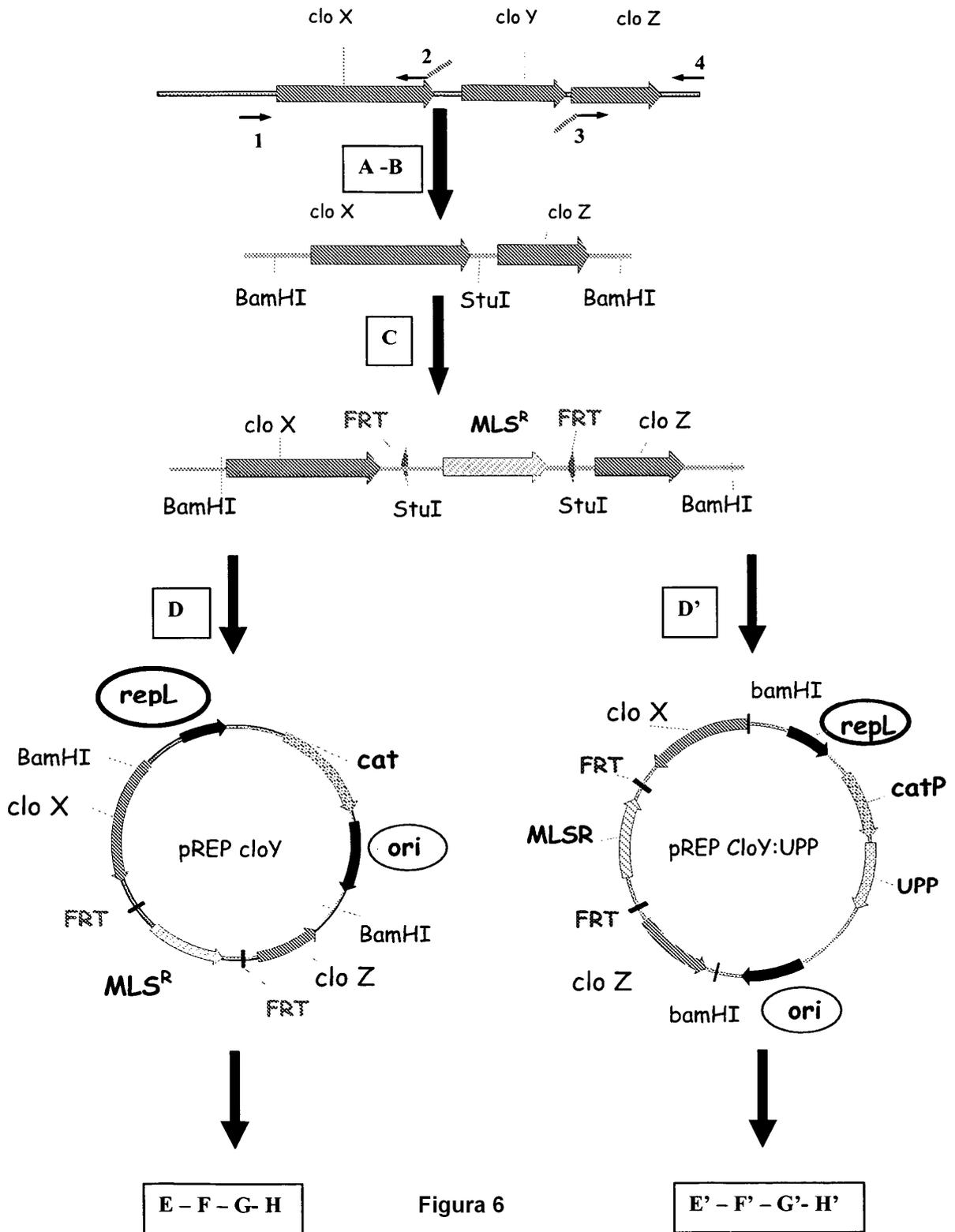


Figura 6