(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 380 000**

(51) Int. CI.:
C12N 15/77 (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07123772 .1**
(96) Fecha de presentación: **21.12.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1908841**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

(54) Título: **Promotores múltiples y su uso para la expresión de genes**

(30) Prioridad:
22.12.2004 DE 102004061846

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

(73) Titular/es:
BASF SE
67056 Ludwigshafen , DE

(72) Inventor/es:
Haefner, Stefan;
Schröder, Hartwig;
Zelder, Oskar;
Klopprogge, Corinna y
Herold, Andrea

(74) Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

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

Promotores múltiples y su uso para la expresión de genes

La presente invención se refiere a una bacteria corineforme genéticamente modificada, transformada con al menos un vector que contiene al menos un casete de expresión, en cuyo caso el casete de expresión en dirección 5' - 3' comprende un módulo de secuencia de la siguiente fórmula general II:

5' -P_1-(-A_x-P_x-)$_n$-A_y-P_y-G-3' (II)

donde

n representa un valor de número entero de 0 a 10,

A_x y A_y son iguales o diferentes y representan un enlace químico o una secuencia de ácido nucleico – enlazadora;

P_1, P_x y P_y representan secuencias promotoras iguales o diferentes derivadas de bacterias corineformes iguales o diferentes que comprenden al menos un segmento que enlaza polimerasa-ARN; y al menos P_y comprende un segmento de secuencia 3' –terminal, que interviene en el enlace de ribosoma,

G representa al menos una secuencia de ácido nucleico codificante que está conectada funcionalmente con la secuencia regulatoria situada 5' - corriente arriba;

así como a procesos para la preparación de productos biosintéticos mediante el cultivo de la bacteria corineforme genéticamente modificada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Diferentes productos biosintéticos se preparan mediante procesos metabólicos naturales en las células y se usan en muchas ramas de la industria, incluida la industria de productos alimenticios, de forrajes y piensos, de cosméticos, de comida para animales y alimento para humanos. Estas sustancias, que se denominan en conjunto como productos de la química fina / proteínas, comprenden, entre otros, ácidos orgánicos tanto aminoácidos proteinogénicos como también

no proteinogénicos, nucleótidos y nucleósidos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, así como proteínas y enzimas. Su producción se efectúa a gran escala de la manera más conveniente por medio del cultivo de cepas de bacterias o de otros microorganismos que se desarrollaron para producir y secretar grandes cantidades de la sustancia deseada. Para este propósito organismos particularmente adecuados son bacterias corineformes, bacterias gram positivas no patógenas.

Es conocido que pueden producirse aminoácidos mediante fermentación de cepas de bacterias corineformes, principalmente Corynebacterium glutamicum. Debido a la gran importancia se trabaja permanentemente en el mejoramiento de los métodos de producción. Los mejoramientos del método pueden referirse a medidas industriales de fermentación, como por ejemplo agitación y suministro de oxígeno, o la composición de los medios de nutrición como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el procesamiento para elaborar un producto, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico aunque también secamiento por pulverización, o las propiedades de desempeño intrínsecas del microorganismo mismo.

Desde hace unos años se emplean igualmente métodos de la tecnología de ADN recombinante para el mejoramiento de cepas de Corynebacterium que producen productos de química fina/proteínas, amplificando genes individuales e investigando el efecto en la producción de productos de química fina / proteínas.

Otras formas para desarrollar un método para la producción de productos de química fina o proteínas o para elevar o mejorar la productividad de un método ya existente para la producción de productos de química fina o proteínas comprenden el incremento o la modificación de la expresión de uno o varios genes y/o la influencia de la traducción de un ARNm mediante secuencias adecuadas de polinucleótidos. La influencia puede comprender en este contexto el incremento, la reducción o también otros parámetros de la expresión de los genes, como patrón temporal de expresión.

El experto en la materia conoce diferentes componentes de secuencias de regulación bacterianas. Se distinguen los puntos de enlace de reguladores, llamados también operadores, los puntos de enlace de ARN-polimerasa-holoenzimas, también llamadas regiones 35 y 10, y el sitio de enlace de ARN 16S ribosómico, también llamado sitio de enlace ribosómico (RBS) o llamado también secuencia Shine-Dalgarno.

En la bibliografía (E. coli y S. typhimurium, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) se describe que tanto la composición de la secuencia de polinucleótido de la secuencia Shine-Dalgarno, la sucesión de secuencia de las bases, pero también la distancia de una secuencia de polinucleótido que está contenida en la secuencia Shine-Dalgarno hasta el codón de inicio, tienen una influencia esencial en la velocidad de la traducción.

Las secuencias de ácido nucleico con actividad de promotor pueden influir de manera diferente la formación de ARNm. Los promotores cuyas actividades son independientes de la fase fisiológica de crecimiento del organismo se llaman constitutivos. Otros promotores a su vez reaccionan a estímulos externos químicos y físicos, como oxígeno, metabolitos, calor, pH, etc. A su vez, otros muestran en diferentes fases de crecimiento una fuerte dependencia de su actividad. Por ejemplo, en la bibliografía se describen promotores que muestran una actividad particularmente pronunciada durante la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos, aunque también en la fase estacionaria del crecimiento microbiano. Ambas características de los promotores pueden tener una influencia favorable en la productividad para una producción de productos de química fina y proteínas, según la ruta metabólica.

En especies de Corynebacterium podían aislarse ya aquellas secuencias que pueden utilizarse para un incremento o un debilitamiento de la expresión génica. Estos promotores regulados pueden incrementar o reducir la velocidad con la que un gen se transcribe, independientemente de las condiciones internas y/o externas de la célula. La presencia de un factor determinado, conocido como inductor, puede estimular en parte la velocidad de la transcripción del promotor. Los inductores puede influenciar directa, pero también indirectamente, la transcripción del promotor. Otra clase de factores conocidos como supresores está en capacidad de reducir, pero también de inhibir, la transcripción, del promotor. Tal como los inductores también, los supresores también pueden actuar directa o indirectamente. Sin embargo, también se conocen promotores que se regulan mediante la temperatura. De esta manera el nivel de transcripción de tales promotores puede elevarse o atenuarse elevando la temperatura de crecimiento por encima de la temperatura normal de crecimiento de la célula.

Hasta el día de hoy se ha descrito una cantidad baja de promotores de C. Glutamicum. El promotor del gen de malato-sintasa de C. Glutamicum se describió en DE-A- 44 40 118. Este promotor se inserta corriente arriba de un gen estructural que codifica una proteína. Después de la transformación de una estructura así en una bacteria corineforme, se regula la expresión del gen estructural insertado corriente abajo del promotor. La expresión del gen estructural se induce tan pronto se adiciona al medio un inductor correspondiente.

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) han descrito una fusión de transcripción entre el promotor pta-ack de C. glutamicum y un gen reportero (cloramfenicol acetiltransferasa). Las células de C. Glutamicum que contienen una fusión de transcripción así, tienen una expresión elevada del gen reportero al crecer en medio que contiene acetato. Al compararse con éstas, las células transformadas que crecían en glucosa no mostraron expresión incrementada de este gen reportero.

En Patek et al., Microbiology 142:1297 (1996) se describieron algunas secuencias de ADN a partir de C. glutamicum, las cuales pueden reforzar la expresión de de un gen reportero en células de C. glutamicum. Estas secuencias se compararon entre sí para definir secuencias de consenso para promotores de C. Glutamicum.

Otras secuencias de ADN de C. glutamicum, las cuales pueden utilizarse para la regulación de la expresión génica se habían descrito en la WO 02/40679. Estos polinucleótidos aislados representan unidades de expresión de corynebacterium glutamicum, las cuales pueden utilizarse o bien para el incremento o, no obstante, para la reducción de una expresión de gen. Además, en este documento se describen plásmidos recombinantes en los que se asocian las unidades de expresión de corynebacterium glutamicum con genes heterólogos. Los métodos aquí descritos, la fusión de un promotor de corynebacterium glutamicum con un gen heterólogo, pueden emplearse, entre otras, para la regulación de los genes de la biosíntesis de aminoácidos.

De las solicitudes de patente más antiguas, no publicadas previamente, DE-A-103 59 594, DE-A-103 59 595, DE-A-103 59 660 y DE-A-10 2004 035 065 se conocen promotores individuales especiales de C. glutamicum.

Descripción breve de la invención

El objetivo fundamental de la invención era suministrar más bacterias corineformes genéticamente modificadas que se transforman con un vector que contiene un casete de expresión. Estas bacterias corineformes genéticamente modificadas tienen propiedades ventajosas con respecto a la expresión de determinados genes. El objetivo se logró de acuerdo con la invención proporcionando una bacteria corineforme genéticamente modificada, transformada con al menos un vector que contienen al menos un casete de expresión, en cuyo caso el casete de expresión comprende un módulo de secuencia en dirección 5' - 3' de la siguiente fórmula general:

$5' -P_1-(-A_x-P_x-)_n-A_y-P_y-G-3'$ (II)

donde

n representa un valor de número entero de 0 a 10,

A_x y A_y son iguales o diferentes y representan un enlace químico o una secuencia de enlazante-ácido nucleico;

P_1, P_x y P_y codifican secuencias de promotor iguales o diferentes derivadas de bacterias corineformes iguales o diferentes, que comprenden al menos un segmento que enlaza ARN-polimerasa; y al menos P_y comprende un segmento de secuencia 3'-terminal, que interviene en el enlace de ribosoma,

G representa al menos una secuencia de ácido nucleico codificante, la cual está unida funcionalmente con la secuencia regulatoria situada 5' – corriente arriba.

Según una forma de realización, P_1, P_x y P_y se derivan de bacterias corineformes iguales o diferentes.

Según una forma de realización preferida, P_1, P_x y P_y se derivan respectivamente de una secuencia continua de 35 a 500 residuos de nucleótido, preferible 35 a 300 residuos de nucleótido, aún más preferible 35 a 210 residuos de nucleótido y muy particularmente preferible 35 a 100 residuos de nucleótidos, la cual se encuentra en el genoma del organismo 5'-corriente arriba de la secuencia codificante para una proteína, por ejemplo para una proteína que interviene en una vía de biosíntesis del organismo.

Según una forma preferida de realización, P_1, P_x y P_y de la unidad de expresión se seleccionan independientemente entre sí entre secuencias de promotor para la secuencia codificante de una proteína con alta abundancia en una bacteria corineforme, como por ejemplo en una del género corynebacterium o brevibacterium, como por ejemplo de una especie o de una cepa según la lista en la tabla 3.

Adicionalmente, entre las secuencias del promotor pueden seleccionarse secuencias de promotor, individuales o todas ellas, para la secuencia codificante de una proteína listada en la tabla 1 y que participa en la biosíntesis de aminoácido de un microorganismo. Pero al menos uno de los promotores del casete de expresión debe tener en tal caso una alta abundancia, tal como aquí se define.

Según otra forma preferida de realización, P_1, P_x y P_y del casete de expresión se seleccionan independientemente entre sí entre las secuencias de nucleótidos representadas en la figura 1, o como más tarde aún se explicará, se derivan de SEQ ID NO:1 (pGRO), SEQ ID NO:2 (pEFTs), SEQ ID NO:3 (pEFTu) y SEQ ID NO: 4 (pSOD).

Según otra forma de realización, P_1, P_x y P_y del casete de expresión se seleccionan independientemente entre sí entre los promotores fuertes constitutivos o regulables.

La bacteria de la invención contiene un casete de expresión que comprende un módulo de secuencia en dirección 5'-3' de la siguiente fórmula general II:

$$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}G\text{-}3' \qquad (II)$$

donde

n, A_x, A_y, P_1, P_x y P_y son tal como se definieron arriba y G representa al menos una secuencia de ácido nucleico codificante, la cual está unida funcional u operativamente con la secuencia regulatoria situada 5'-corriente arriba.

Según una forma preferida de realización del casete de expresión G se selecciona entre

a) ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos,

b) ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos,

c) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos,

d) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos,

e) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de dioles,

f) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de carbohidratos,

g) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos,

h) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de vitaminas,

i) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de cofactores,

j) ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de enzimas, y

k) ácidos nucleicos que codifican una proteína del metabolismo central.

Según una forma particularmente preferida de realización del casete de expresión G se selecciona entre ácidos nucleicos que codifican proteínas a partir de la vía de biosíntesis de aminoácidos, seleccionados entre cinasa de aspartato, deshidrogenasa de semialdehído de aspartato, deshidrogenasa de diaminopimelato, descarboxilasa de diaminopimelato, sintetasa de dihidrodipicolinato, reductasa de dihidrodipicolinato, deshidrogenasa de glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, cinasa de 3-fosfoglicerato, carboxilasa de piruvato, isomerasa de triosafosfato, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, oxidoreductasa de malato-quinona, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato, deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, transcetolasa, transaldolasa, O-acetiltransferasa de homoserina, gamma-sintasa de cistationina, beta-liasa de cistationina, hidroximetiltransferasa de serina, sulfhidrilasa de O-acetilhomoserina, reductasa de metilen-tetrahidrofolato, aminotransferasa de fosfoserina, fosfatasa de fosfoserina, transferasa de serina-acetilo, deshidrogenasa de homoserina, cinasa de homoserina, sintasa de treonina, treonina-exportador-portador, deshidratasa de treonina, oxidasa de piruvato, exportador de lisina, ligasa de biotina, sintasal de cisteína, sintasa II de cisteína, sintasa de metionina dependiente de la coenzima B12, subunidades 1 y 2 de sulfatadeniltransferasa, reductasa de fosfosulfato fosfoadenosina, reductasa de ferredoxina-sulfito, reductasa ferredoxina NADP, deshidrogenasa de 3-fosfoglicerato, regulador RXA00655, regulador RXN2910, sintetasa de ARNt arginilo, carboxilasa de fosfoenolpiruvato, proteína de treonina Efflux, serinhidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructocinasa y 6-fosfofructocinasa, succinilasa de tetrahidropicolinato, aminotransferasa de succinil-aminocetopimelato, desuccinilasa de succinil-diaminopimelato, epimerasa de diaminopimelato, dehidrogenasa de 6-fosfogluconato, isomerasa de glucosafosfato, mutasa de fosfoglicerato, enolasa, cinasa de piruvato, transaminasa de aspartato, enzima de malato.

La bacteria de la invención se transforma con un vector que comprende al menos uno de los casetes de expresión previamente mencionados.

La presente invención se refiere a una bacteria corineforme genéticamente modificada que se transforma con al menos uno de los vectores mencionados previamente, o contiene al menos uno de los casetes de expresión previamente mencionados, preferiblemente en forma integrada.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un producto biosintético, en cuyo caso se cultiva una de las bacterias corineformes genéticamente modificadas, previamente mencionadas y el producto deseado se aísla del cultivo.

Según una forma de realización del método el producto biosintético se selecciona entre ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos y nucleósidos, aminoácidos tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, enzimas y proteínas. Productos de biosíntesis muy particularmente preferidos son lisina, metionina, treonina y trehalosa.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra secuencias específicas para cuatro promotores que se usan para la preparación de los promotores múltiples descritos en los ejemplos de realización. Se representan las secuencias de promotor para pEFTu (Figura 1A); para el promotor pGRO (Figura 1 B), para el promotor pEFTs (Figura 1 C) y para el promotor pSOD (figura 1D). Para cada promotor se indican dos secuencias, la más larga (secuencia superior) indica respectivamente la secuencia completa de promotor que incluye el sitio de enlace ribosómico (RBS), impreso en letra negrilla y cursiva. En el caso de una disposición 3'-terminal del promotor respectivo en el constructo de promotor múltiple se usa en cada caso respectivamente la secuencia de nucleótido más larga (incluido RBS). Las secuencias de promotor, 5'-corriente arriba hacia la unidad del promotor 3'-terminal no comprenden RBS y se usaron en la secuencia de ácido nucleico abreviada, indicada en la segunda posición respectivamente (sin RBS). Secuencias parciales 3'-terminales, indicadas en letras mayúsculas y negrillas, de las secuencias más cortas de promotor opcionalmente pueden faltar. "Regiones-10" potenciales se representan subrayadas.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones generales:

Por un "producto biosintético" en el sentido de la invención se entienden aquellos que se producen mediante procesos metabólicos naturales (vías de biosíntesis) en células. Se usan de múltiples maneras, principalmente en la industria de productos alimenticios, de forrajes y piensos, de cosméticos, de comida para animales y alimentos para humanos, y en la industria farmacéutica. Estas sustancias, que se denominan en conjunto productos de química fina / proteínas, comprenden entre otros ácidos orgánicos, aminoácidos tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, nucleótidos y nucleósidos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, así como proteínas y enzimas.

Por un "promotor", un "ácido nucleico con actividad de promotor" o una "secuencia de promotor" se entiende un ácido nucleico que regula la transcripción de este ácido nucleico al estar enlazado con un ácido nucleico a transcribir.

En tanto no se haga referencia expresa a "promotores individuales", el término "promotor" también abarca, según el contexto, la disposición secuencial de más de una secuencia de ácido nucleico (es decir "promotores múltiples"), cada uno de los cuales individualmente sería capaz de regular la transcripción de un ácido nucleico a transcribirse, al enlazarse funcionalmente con éste.

El término "promotor individual" se refiere de manera correspondiente a una única secuencia de ácido nucleico que es capaz de regular la transcripción de un ácido nucleico a transcribirse y que al enlazarse funcionalmente con una secuencia de ácido nucleico a transcribirse puede transcribirla.

En el caso de "promotores múltiples", al menos dos secuencias de ácido nucleico, iguales o diferentes, de las cuales cada una individualmente al enlazarse funcionalmente con un ácido nucleico a transcribir sería capaz de regular su transcripción (promotores individuales), se enlazan secuencialmente de tal manera que un inicio de transcripción de, opcionalmente, una de las secuencias de ácido nucleico podría producir un transcripto que contiene el ácido nucleico a transcribir. Entre dos promotores individuales respectivamente pueden insertarse más secuencias son función de promotor, por ejemplo un linker (enlazador) que tiene, por ejemplo, uno o más sitios de corte de restricción. Opcionalmente, dos promotores individuales pueden enlazarse entre sí respectivamente de manera directa. Preferiblemente los promotores múltiples contienen solamente un sitio de enlace ribosómico (RBS), principalmente en la región del extremo 3'-terminal del promotor.

Por secuencia de promotores para la secuencia codificante de una proteína con "alta abundancia" se entienden principalmente "promotores fuertes". Si se desea emplear promotores múltiples para reforzar genes, se combinan preferiblemente aquellos promotores fuertes de manera adecuada. Los promotores fuertes regulan la transcripción de genes de tal forma que la frecuencia de lectura por la polimerasa de ARN es mayor que en el caso de la mayoría de los genes del organismo. En la mayoría de los casos la presencia de un promotor fuerte resulta en que también se presenta una gran cantidad de transcripto en la célula. Si el transcripto adopta una participación porcentual mayor en relación con otros transcriptos celulares, se habla de un "transcripto abundante". En bacterias, la cantidad de transcripto y de la proteína codificada correspondiente del mismo se correlacionan por lo regular; es decir, "transcriptos abundantes" conducen casi siempre a "proteínas abundantes". A continuación se describe, por ejemplo, un método que permite la identificación de "promotores fuertes" mediante la abundancia de proteínas. Detalles sobre el procedimiento metódico así como otras referencias pueden encontrarse, por ejemplo, en Proteomics in Practice - A Laboratory Manual of Proteome Analysis (autores: R. Westermeier, T. Naven; editorial: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002). Las células bacterianas se abren y las proteínas del extracto celular se dividen por medio de electroforesis de gel 2D. Las proteínas se tiñen entonces por métodos comunes tales como, por ejemplo, teñido con Coomassie, tinta fluorescente o plata. El sobreteñido de la proteína se evita aquí para posibilitar que las manchas de la proteína individual se cuantifiquen después. Subsecuentemente, el gel se explora y la imagen obtenida se evalúa con la ayuda de un programa de ordenador adecuado (por ejemplo, Melanie, de Amersham Biosciences). Para este propósito, primero se identifican todas las manchas detectables y se determina el volumen de la mancha. La suma de todos los volúmenes de las manchas corresponde, en una primera aproximación, a la proteína total. Con ayuda del programa de ordenador para análisis de imagen, pueden seleccionarse entonces las manchas con volúmenes de mancha particularmente grandes. Por ejemplo, las manchas con volúmenes que ocupan más del 0.1% del volumen de manchado total pueden denominarse abundantes. Subsecuentemente, las manchas que contienen proteínas particularmente abundantes se extraen del gel. Normalmente, la proteína presente en el gel se digiere entonces de manera proteolitica (por ejemplo, con tripsina) y se determina la masa molar de los péptidos resultantes, por ejemplo con la ayuda de MALDI-ToF MS (Matrix assisted laser desorption ionization - Time of Flight Mass Spectrometry o ionización de desorbción láser asistida por matriz espectrometría de masas de tiempo de vuelo). Con base en la masa molar de algunos de los péptidos trípticos de la proteína, se puede entonces identificar la proteína correspondiente en los registros de las bases de datos. Esto es posible en particular sí el genoma del organismo a estudiarse ha sido secuenciado, como es el caso de la C. glutamicum, E. coli, y muchas otras bacterias. La ORF (estructura de lectura abierta) que codifica dicha proteína puede entonces determinarse con base en la identidad de dicha proteína. En las bacterias, los promotores que regulan dicho gen están usualmente localizados inmediatamente corriente arriba del codón de inicio. Por lo tanto, los promotores "fuertes" también se encuentran

frecuentemente en una región de aproximadamente 200 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de proteínas "abundantes".

Promotores "artificiales" comprenden en particular aquellas secuencias que no tienen actividad transcripcional in situ y las cuales son transcripcionalmente activas en otro contexto de secuencia, tal como principalmente en el contexto de una unidad de expresión o casete de expresión de la invención.

Por "actividad del promotor" se entiende la cantidad de ARN formado por el promotor en un tiempo particular, es decir, la velocidad de transcripción.

Por actividad del promotor "especifica" se entiende la cantidad por cada promotor de ARN formado mediante el promotor en un tiempo determinado.

En una actividad del promotor "provocada", o una velocidad de transcripción con respecto a un gen, en comparación con el tipo silvestre, la formación de un ARN que no estaba presente en este tipo silvestre se provoca de esta manera en comparación con el tipo silvestre.

En una actividad del promotor "modificada" o una velocidad de transcripción con respecto a un gen, en comparación con el tipo silvestre, la cantidad formada de ARN se modifica de esta manera en comparación con el tipo silvestre en un tiempo determinado.

Por "modificada" se entiende este contexto preferiblemente incrementada o reducida.

Por un enlace "funcional" u "operativo" se entiende en este contexto, por ejemplo, la disposición secuencial de un ácido nucleico con actividad de promotor y de una secuencia de ácido nucleico a transcribirse y opcionalmente otros de elementos regulatorios como, por ejemplo, de una secuencia de ácido nucleico, los cuales garantizan la transcripción de ácidos nucleicos, así como por ejemplo, un terminador de tal modo que cada uno de los elementos regulatorios puede cumplir su función en la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Esto no requiere necesariamente un enlace directo en el sentido químico. Secuencias de control genéticas tales como, por ejemplo, secuencias reforzadoras también pueden ejercer su función en la secuencia objetivo desde posiciones más distantes o aún desde otras moléculas de ADN. Se da preferencia a disposiciones en las que la secuencia del ácido nucleico a transcribirse se posiciona detrás (es decir, en el extremo 3') de la secuencia del promotor, de manera que las dos secuencias están conectadas de manera covalente entre sí. La distancia entre la secuencia del promotor y la secuencia del ácido nucleico a expresarse de manera transgénica es aquí preferiblemente de menos de 200 pares de bases, particularmente preferible de menos de 100 pares de bases, muy particularmente preferible de menos de 50 pares de bases.

Como secuencia de un "sitio de enlace ribosómico" o "sitio de enlace de ribosoma" (RBS) (o denominado secuencia Shine - Dalgarno) se entienden secuencias de polinucleótidos ricas en A/G que se encuentran hasta 30 bases corriente arriba del codón de inicio de la traducción.

Por "transcripción" se entiende el proceso por el cual a partir de una matriz de ADN se produce una molécula de ARN complementaria. En este proceso intervienen proteínas, como la polimerasa de ARN, los llamados factores sigma y las proteínas reguladoras transcripcionales. Entonces, el ARN sirve como matriz en el proceso de traducción que conduce luego a la proteína biosintéticamente activa.

Por una "región núcleo" de un promotor se entiende una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 20 a 80, o 30 a 60, nucleótidos, que comprende al menos una llamada "región-10" potencial. Ejemplos de regiones –10 potenciales se describen aquí para secuencias de promotor preferidas individuales; compárese principalmente la Figura 1. "regiones-10" también se denominan cajas TATA o secuencias Pribnow-Schaller. Cada promotor empleado debería contener al menos una de estas regiones-10 potenciales, como por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5. La región núcleo se localiza 5' corriente arriba del RBS y puede estar a una distancia de ésta de 1 a 200 o 10 a 150 o 20 a 100 residuos de nucleótidos.

Por una "unidad de expresión" se entiende un ácido nucleico que tiene actividad de expresión, que comprende un promotor múltiple como se definió aquí y el cual, después de la unión funcional a un ácido nucleico o un gen a expresarse, regula la expresión, es decir, la transcripción o la traducción, de este ácido nucleico o de este gen. Por esto, en este contexto también se habla de una "secuencia de ácido nucleico reguladora". Además del constructo del promotor múltiple, pueden estar contenidos otros elementos reguladores tales como, reforzadores (enhancer), por ejemplo.

Por un "casete de expresión" se entiende una unidad de expresión que esta enlazada de manera funcional al ácido nucleico a expresarse o al gen a expresarse. En contraste a una unidad de expresión, un casete de expresión comprende de esta manera no solo secuencias de ácidos nucleicos que regulan la transcripción y traducción, sino

también las secuencias de ácidos nucleicos las cuales deben expresarse como proteína como resultado de la transcripción y traducción.

Por "actividad de expresión" se entiende la cantidad de proteína formada por el casete de expresión o su unidad de expresión en un tiempo determinado; es decir, la velocidad de expresión.

Por "actividad de expresión especifica" se entiende la cantidad de proteína formada por el casete de expresión o su unidad de expresión en un tiempo determinado, por unidad de expresión.

En el caso de una "actividad de expresión provocada" o velocidad de expresión con respecto a un gen, en comparación con el tipo silvestre, se provoca de esta manera la formación de una proteína que no estaba presente en esta forma en el tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre.

En el caso de una "actividad de expresión modificada" o velocidad de expresión con respecto a un gen en comparación con el tipo silvestre, se altera de esta manera la cantidad de proteína formada en un tiempo determinado en comparación con el tipo nativo. En este contexto, por "modificada" se entiende incrementada o reducida, preferiblemente. Esto puede efectuarse, por ejemplo, incrementando o reduciendo la actividad específica de la unidad de expresión endógena, por ejemplo por mutación o por estimulación o inhibición. La actividad de expresión modificada, o velocidad de expresión, pueden lograrse además, por ejemplo, regulando la expresión de genes en el microorganismo por unidades de expresión de la invención, en cuyo caso los genes son heterólogos con respecto a las unidades de expresión.

La "velocidad de formación" a la cual se produce una proteína biosintéticamente activa es un producto de la velocidad de transcripción y la traducción. Ambas velocidades pueden ser influenciadas y de esta manera influenciar la velocidad de formación de los productos/productos de química fina en un microorganismo.

Por el término "tipo silvestre" se entiende el microorganismo de partido correspondiente y no debe corresponder obligatoriamente a un organismo de procedencia natural.

Según el contexto, por el término "microorganismo" pueden entenderse el microorganismo de partida (tipo silvestre) o un microorganismo genéticamente modificado de la invención o ambos.

Preferiblemente y en particular en casos en los que no es posible clasificar el microorganismo o el tipo silvestre de manera unívoca, por "tipo silvestre" se entiende un "organismo de referencia" para modificar o provocar la actividad del promotor o la velocidad de trascripción, para modificar o provocar la actividad de expresión o la velocidad de expresión y para incrementar el contenido de producto biosintético, respectivamente. En una modalidad preferida, este "organismo de referencia" es Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 o un microorganismo que se deriva de ATCC 13032 por mutación dirigida o no dirigida.

Principalmente se usan "microorganismos de partida" que ya están en capacidad de producir el producto deseado (productos de química fina/ proteína).

Por una secuencia "derivada", por ejemplo una secuencia de promotor derivada, si no se hacen otras indicaciones, se entiende una secuencia que tiene una identidad con la secuencia de partida de al menos 80% o al menos 90%, principalmente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99%.

Por "identidad" entre dos ácidos nucleicos se entiende la identidad de los nucleótidos por toda la longitud del ácido nucleico, principalmente la identidad que se calcula con ayuda del programa de ordenador Vector NTI Suite 7.1 de la empresa Informax (USA) aplicando el método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Ap;5(2):151-1) ajustando los siguientes parámetros:

Multiple alignment parameter:
Gap opening penalty 10
Gap extension penalty 10
Gap separation penalty range 8
Gap separation penalty off
% identity for alignment delay 40
Residue specific gaps off
Hidrophilic residue gap off

Transition weighing 0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on
K-tuplesize 1
Gap penalty 3
Window size 5
Number of best diagonals 5

Por "hibridar" se entiende la capacidad de un poli- u oligonucleótido de enlazarse en condiciones severas a una secuencia casi complementaria, mientras que en estas condiciones no se forman enlaces no específicos entre partes no complementarias. Para este propósito, las secuencias deben ser complementarias preferiblemente 90-100%. La propiedad de las secuencias complementarias de ser capaces de poder enlazarse de manera específica entre sí se aprovecha, por ejemplo en la técnica de Northern- o Southern-Blot o en la unión de cebador en PCR o RT-PCR.

La "hibridación" se efectúa en condiciones severas. Las condiciones de la hibridación de este tipo se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., en: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por condiciones de hibridación severas se entienden principalmente:
La incubación a 42°C por una noche en una solución que se compone de formamida 50 %, 5 x SSC (NaCl de 750 mM, citrato trisódico de 75 mM), fosfato de sodio de 50 mM (pH7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano de 10% y 20 g/ml de ADN de esperma de salmón cizallado, desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros con 0.1 x SSC a 65° C.

Por "esencialmente idéntica" se entiende una actividad del promotor especifica que tiene al menos 50%, como por ejemplo al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95% de la actividad del promotor específica de la secuencia de partida.

II. Unidades de expresión, casetes de expresión y sus componentes

a) Unidades de expresión

La invención se refiere a bacterias corineformes genéticamente modificadas que se transformaron con al menos un vector que contiene al menos un casete de expresión. Casetes de expresión contienen unidades de expresión que contienen promotores múltiples, unidos funcionalmente con una secuencia de ácido nucleico traducible.

Esta unidad de expresión que contiene un promotor múltiple, comprende un módulo de secuencia en dirección 5'-3' de la siguiente fórmula general (I)

$5'\text{-}P_1\text{-}(\text{-}A_x\text{-}P_x\text{-})_n\text{-}A_y\text{-}P_y\text{-}3'$

donde

n representa un valor de números enteros de 0 a 10, como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

A_x y A_y son iguales o diferentes y representan un enlace químico, principalmente covalente, o una secuencia de ácido nucleico - enlazador químicamente integrada, en particular integrada de manera covalente;

P_1, P_x y P_y codifican secuencias de promotor iguales o diferentes derivadas de bacterias corineformes iguales o diferentes, las cuales comprenden al menos una región que enlaza polimerasa de ARN, como por ejemplo una región de núcleo; y al menos, solo como por ejemplo, P_y comprende un segmento de secuencia 3'-terminal que facilita el enlace de ribosoma.

Las secuencias de promotor P_1, P_x y P_y pueden derivarse de genes de bacterias corineformes que codifican proteínas que intervienen en una vía de biosíntesis del organismo. Las secuencias de promotor se encuentran en tal caso en el genoma del organismo 20 a 500 residuos de nucleótidos, o 20 a 300 residuos de nucleótidos, por ejemplo 20 a 210 residuos de nucleótidos y principalmente 20 a 100 o 35 a 100 residuos de nucleótidos 5'-corriente arriba de la secuencia codificante de la proteína respectiva.

Ejemplos de secuencias de las cuales pueden derivarse las secuencias del promotor P_1, P_x y P_y son los genes enlistados en la Tabla 1 más adelante.

Ejemplos no limitantes de secuencias del promotor especiales se derivan de las secuencias del ácido nucleico de acuerdo a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, y la figura 1, aunque sin limitarse a las mismas.

En tal caso, la SEQ ID NO:1 corresponde a la secuencia situada corriente arriba de la región codificante del GroES Chaperonin (pGRO), la SEQ ID NO:2 corresponde a la secuencia que está situada corriente arriba de la región codificante del factor TS de elongación de la proteína (pEFTs), la SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia situada corriente arriba de la región codificante del factor TU de elongación de la proteína (pEFTu) y la SEQ ID NO:4 corresponde a la secuencia situada corriente arriba de la región codificante de la dismutasa de superóxido (pSOD), en cada caso de Corynebacterium glutamicum. Las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 , SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 corresponden a las secuencias del promotor del tipo silvestre.

Por una secuencia "derivada" se entiende una secuencia que tiene una identidad con la secuencia de partida de al menos 80% o al menos 90%, tal como 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y principalmente 99%. Este grado de identidad es válido principalmente para la "región núcleo" anteriormente definida del promotor respectivo. Fuera de la región núcleo respectiva, el grado de identidad en tal caso puede ser más bajo y estar en el intervalo de 0 a 80%, como por ejemplo 10 a 80%, 20 a 70% , 30 a 60% o 40 a 50%.

Regiones núcleo útiles se encuentran, por ejemplo, para pGRO en el intervalo de posición 50 a 80 de SEQ ID NO:1; para pEFTs en el intervalo de posición 130 a 170 de SEQ ID NO:2; para pEFTu en el intervalo de position 30 a 110 de SEQ ID NO:3; para pSOD en el intervalo de posición 50 a 100 de SEQ ID NO:4.

Las unidades de expresión contienen principalmente dos o más secuencias de ácido nucleico con actividad de promotor,

a) preferentemente derivadas de secuencias iguales o diferentes, seleccionadas entre SEQ. ID. NO. 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4; u otras secuencias de promotor para genes con abundancia comparable o superior;

b) en cuyo caso opcionalmente una o más de dichas secuencias representan una secuencia derivada por sustitución, inserción, inversión o deleción (eliminación) o adición de nucleótidos que tiene principalmente en la región núcleo una identidad de al menos 80% a nivel del ácido nucleico con una secuencia preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 u otras secuencias de promotor para genes con abundancia comparable o superior,

c) o en cuyo caso opcionalmente una o más de estas secuencias de ácido nucleico contenidas hibrida con una secuencia en condiciones severas que es complementaria a una de las secuencias de ácido nucleico según SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y/o a otras secuencias de promotor para genes con abundancia comparable o superior.

Otros promotores naturales que pueden utilizarse como un componente de un promotor múltiple de la invención pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diferentes bacterias corineformes cuya secuencia genómica es conocida, comparando las identidades de las secuencias de ácidos nucleicos de bases de datos con las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 anteriormente descritas o de acuerdo a la Figura 1 u otras secuencias de promotor para genes con abundancia comparable o superior.

Otros promotores naturales adecuados pueden detectarse fácilmente a partir de las secuencias de ácido nucleico descritas previamente principalmente a partir de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y/o de secuencias promotor para genes con abundancia comparable o superior de bacterias corineformes diferentes cuya secuencia genómica no se conoce, aplicando técnicas de hibridación de una manera conocida per se.

Otros promotores naturales adecuados también pueden aislarse por métodos conocidos por el experto en la materia, tal como se describen por ejemplo en Cadenas et al (1991) Gene 98, 117-121; Eikmanns et al, (1991) Gene 102, 93-98.; Patek et al (1996) Microbiology 142, 1297-1309 o Santamaria et al (1987) Gene 56, 199-208. Para esto usualmente se usan vectores de "sonda promotora" en los que se insertan fragmentos genómicos del genoma en cuestión. La actividad de promotor de un fragmento individual puede entonces determinarse en el montaje (setup) experimental mencionado midiendo la actividad de un gen reportero corriente abajo, por ejemplo, la acetil transferasa de cloramfenicol.

La unidad de expresión que contiene promotores múltiples también comprende, por lo tanto, la combinación de tales promotores, los cuales no se encuentran enlistados aquí por el nombre. Esto también se refiere a la combinación de promotores individuales ya conocidos, como los descritos, por ejemplo, en (Patek et al (2003). J of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova et al. (1999) J. Bacteriol 181, 6188-6191).

Ácidos nucleicos con actividad de promotor para incorporación a una unidad de expresión que contiene promotores múltiples, también comprenden los ácidos nucleicos con actividad de promotor que comprenden una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones severas con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 o secuencias de promotor para genes con abundancia comparable o superior. Esta secuencia de ácido nucleico comprende al menos 10, preferible más de 12, 15, 30, 50 o más de 150 nucleótidos.

Secuencias promotoras artificiales para la incorporación a una unidad de expresión que comprende promotores múltiples pueden prepararse fácilmente a partir de la secuencia SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 o de acuerdo con la Figura 1 y/o las secuencias de promotor para genes con abundancia comparable o superior mediante variación artificial y mutación, por ejemplo mediante adición, sustitución, inserción, inversión o eliminación de uno o varios residuos de nucleótidos individuales o contiguos. (Patek et al (2003). J of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova et al. (1999) J. Bacteriol 181, 6188-6191) y las referencias mencionadas allí).

Segmentos adecuados de secuencia 3'-terminal, que facilitan el enlace de ribosomas, de una secuencia de promotor P_y son, por ejemplo, el RBS de pGRO: GGAGGGA; el RBS de pEFTs: AGGAGGA; el RBS de pEFTu: AGGAGGA; así como el RBS de pSOD : GGAGGGA (compárese también la figura 1 adjunta). El RBS óptimo por teoría, es decir la secuencia que es 100 % complementara para la secuencia anti-Shine-Dalgarno en el ARNr 16S de C. glutamicum es: 5'GAAAGGAGG3'. Otros segmentos de secuencia RBS adecuados pueden producirse por ejemplo mediante variación artificial y mutación, por ejemplo por sustitución, inserción, inversión, adición o eliminación de nucleótidos, o detectarse por comparaciones de homología con secuencias de promotor en los bancos de datos.

Ejemplos no limitantes de unidades de expresión que contienen promotores múltiples se seleccionan entre:

e) Secuencias que codifican

PeftuPsod, de posición 18 a 390 en SEQ ID NO: 45;

PsodPeftu, de posición 18 a 395 en SEQ ID NO: 52;

PgroPsod, de posición 18 a 369 en SEQ ID NO: 55;

PgroPsodPefts, de posición 11 a 538 en SEQ ID NO: 59;

PeftuPsodPefts; de posición 11 a 559 en SEQ ID NO: 60;

o

f) Secuencias derivadas de secuencias según e) mediante sustitución, inserción, inversión, adición o eliminación de nucleótidos que en comparación con esta secuencia de partida tienen una identidad de al menos 80 % o al menos 90% a nivel de ácido nucleico; o

g) Secuencias de ácido nucleico, que hibridan con una secuencia complementaria a e) en condiciones severas;

Las unidades de expresión pueden comprender preferentemente uno o varios de los siguientes elementos genéticos: una región-10; un inicio de transcripción, una región de reforzador (enhancer); y una región de operador.

Estos elementos genéticos son específicos para las especies corinebacteria, especialmente para Corynebacterium glutamicum.

Los promotores bacterianos normalmente consisten de tres sitios de reconocimiento de la polimerasa de ARN, más precisamente la región -10, la región -35 y el elemento UP. Estos elementos promotores son altamente conservados en E.coli aunque no en C. glutamicum. Esto se refiere especialmente a la región -35. Con frecuencia este puede por lo tanto no derivarse de la secuencia, o puede derivarse solo de manera no confiable. La región -10 igualmente es menos fuertemente conservada que en organismos con genomas ricos en AT. Como secuencias de consenso aquí se han prescrito TGNGNTA(C/T)AATGG o GNTANAATNG (Patek et al (2003), J. of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova et al. (1999) J. Bacteriol 181, 6188-6191).

En general se conoce que en bacterias con un contenido de GC moderado o alto (como, por ejemplo, C. glutamicum) ocurre en general una alta variabilidad en las secuencias de consenso (Boum and Babb, 1995., Bashiam et al, 1996). Esto es válido particularmente para la región -35 que por lo tanto con frecuencia no puede pronosticarse. Esto se describe, por ejemplo, en Patek et al (2003). J of Biotechnology 104, 325-334.

b) Casetes de expresión

Unidades de expresión que contienen promotores múltiples, funcionalmente unidas con una secuencia de ácido nucleico traducible, se denominan casetes de expresión.

Por un "enlace funcional" en este contexto se entiende, por ejemplo, la disposición secuencial de una de las unidades de expresión y de una secuencia de ácido nucleico a expresarse de manera transgénica y opcionalmente

de otros elementos reguladores tal como un terminador, por ejemplo, de tal modo que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir una función en la expresión transgénica de la secuencia del ácido nucleico. Para esto no se requiere obligatoriamente un enlace directo en el sentido químico. Las secuencias de control genético tales como, por ejemplo, secuencias reforzadoras (enhancer) también pueden ejercer su función en la secuencia objetivo desde posiciones más distantes o aún desde otras moléculas de DNA. Se prefieren disposiciones en las cuales la secuencia de ácido nucleico a expresarse de manera transgénica se posiciona detrás (es decir, en el extremo 3') de la secuencia de la unidad de expresión de la invención, de manera que ambas secuencias se enlazan de manera covalente entre sí. La distancia entre la secuencia de la unidad de expresión y la secuencia del ácido nucleico a expresarse de manera transgénica es aquí preferiblemente de menos de 200 pares de base, particularmente preferible de menos de 100 pares de base, muy particularmente preferible de menos de 50 pares de base.

Por medio de los casetes de expresión que contienen promotores múltiples se crea la posibilidad de lograr una actividad de expresión diferente, en comparación con la actividad de expresión original, y de esta manera efectuar una regulación fina de la expresión del gen deseado.

Preferentemente, la regulación de la expresión de genes en bacteria corineforme se logra mediante unidades de expresión

- introduciendo una o más unidades de expresión, opcionalmente con actividad de expresión específica modificada al genoma de la bacteria corineforme de manera que la expresión de uno o más genes endógenos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión introducidas de la invención; o

- introduciendo a la bacteria corineforme uno o más constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión de la invención, opcionalmente con actividad de expresión específica modificada y enlazando de manera funcional, uno o más ácidos nucleicos a expresarse, es decir, un casete de expresión.

En los casetes de expresión de la invención, la posición física de la unidad de expresión con relación al gen a ser expresado se elige de modo que la unidad de expresión regule la transcripción y preferiblemente también la traducción del gen a expresarse y de esta manera posibilitar la formación de una o más proteínas. "Posibilitar la formación" aquí incluye incrementar de manera constitutiva dicha formación, atenuar o bloquear la formación en condiciones especificas y/o incrementar la formación en condiciones especificas. Las "condiciones" comprenden en tal caso:

(1) adición de un componente al medio de cultivo, (2) retiro de un componente del medio de cultivo, (3) reemplazo de un componente en el medio de cultivo por un segundo componente, (4) incremento de la temperatura del medio de cultivo, (5) reducir la temperatura del medio de cultivo y (6) regular las condiciones atmosféricas tales como, por ejemplo, la concentración de oxígeno o la concentración de nitrógeno, en la que se mantiene el medio de cultivo.

c) Indicaciones generales:

Todos los ácidos nucleicos anteriormente mencionados con actividad de promotor y unidades de expresión y casetes de expresión también pueden prepararse de una manera conocida per se, mediante síntesis química de las unidades estructurales de nucleótidos, por ejemplo mediante condensación de fragmentos de las unidades estructurales de ácidos nucleicos complementarios superpuestos individuales de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede llevarse a cabo, por ejemplo, en una manera conocida per se, según el método de fosfoamidita. (Voet, Voet, 2. Edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). La adición de los oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la polimerasa de ADN y reacciones de ligazón, así como métodos generales de clonación se describen en Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Para las presentes invenciones se utilizaron métodos y técnicas que son conocidas para el experto en la materia que esté ejercitado en las técnicas microbiológicas y de ADN recombinante. Los métodos y técnicas para el crecimiento de células bacterianas, la introducción de moléculas de ADN aisladas a la célula huésped y el aislamiento, clonación y secuenciación de moléculas de moléculas de ácidos nucleicos aisladas, etc., son ejemplos de tales técnicas y métodos. Estos métodos se describen en muchas referencias bibliográficas estándar: Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer and P. Berg, Genes Genomes, University Science Books, Mill Valley, Carlifornia (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989).

Todas las moléculas de ácidos nucleicos se presentan preferiblemente en la forma de una molécula de ácido nucleico aislada. Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede estar además esencialmente libre de otro material celular o medio de cultivo si se produce por técnicas recombinantes, o estar libre de precursores químicos u otros productos químicos, si se sintetiza químicamente.

Las secuencias de nucleótidos de la invención también permiten la generación de sondas y cebadores que pueden utilizarse para identificar y/o clonar secuencias homologas en otros tipos de células y microorganismos. Tales sondas o cebadores usualmente comprenden una región de la secuencia de nucleótido que, en condiciones severas, hibrida en al menos aproximadamente 12, preferiblemente al menos cerca de 25, como por ejemplo cerca de 40, 50 o 75, nucleótidos sucesivos de una cadena sense (sentido) de una secuencia de ácido nucleico de la invención o de una cadena antisense (antisentido) correspondiente.

III. Vectores de expresión

El experto en la materia conoce bien los vectores y éstos pueden encontrarse, por ejemplo, en "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., editores, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Por vectores también se entienden, además de plásmidos, todos los otros vectores conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo fagos, transposones, elementos IS, fásmidos, cósmidos, y ADN lineales o circulares. Estos vectores pueden replicarse de manera autónoma en el organismo huésped o cromosómicamente.

Como plásmidos son adecuados aquellos que se replican en bacterias corineformes. Numerosos vectores de plásmido conocidos, como por ejemplo pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores de plásmido como, por ejemplo, pCLiK5MCS (véase ejemplo 11), o aquellos que se basan en pCG4 (US-A 4,489,160) o pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) o pAG1 (US-A 5,158,891), pueden usarse de igual manera.

Además, también son adecuados aquellos vectores de plásmidos con la ayuda de los cuales puede aplicarse el método de amplificación del gen mediante integración al cromosoma, como se describió, por ejemplo, por Remscheid et al. (Applied and Enviromental Microbiology 60, 126-132 (1994)) para la duplicación o amplificación del operon hom-thrB. En este método, se clona el gen completo en un vector de plásmido que puede replicarse en un huésped (típicamente E. coli) pero no en C. glutamicum. Como vectores se consideran, por ejemplo pSUP301 (Sirnon et al., Bio/Technology 1,784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510--4516) o pBGS8 (Spratt et as.,1986, Gene 41: 337-342). El vector de plásmido que contiene el gen a amplificarse se transfiere a continuación por transformación a la cepa de C. glutamicum deseada. Los métodos de transformación se describen, por ejemplo, en Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican y Shivnan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123,343-347 (1994)).

IV. Genes y proteínas codificadas por los mismos

La velocidad de transcripción y/o la velocidad de traducción de genes en bacterias corineformes, en comparación con el tipo silvestre, pueden alterarse o provocarse regulando la transcripción de genes en la bacteria corineforme mediante unidades de expresión de la invención, en cuyo caso los genes son heterólogos con respecto a las unidades de expresión.

Esto se logra preferiblemente

- introduciendo uno o más ácidos nucleicos con actividad de promotor al genoma de la bacteria corineforme de manera que la transcripción de uno o más genes endógenos se efectúe bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor especifica modificada, o

- introduciendo a la bacteria corineforme uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico con tiene actividad de promotor y, enlazando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos exógenos o endógenos a transcribirse.

Sí uno o más genes se introducen al genoma de la bacteria corineforme de manera que uno o varios genes introducidos se transcriben bajo el control de los ácidos nucleicos de la invención, la inserción puede tener lugar para que el gen o los genes se integren a las regiones codificantes o no codificantes. La inserción preferiblemente tiene lugar a las regiones no codificantes.

La inserción de constructos de ácido nucleico puede efectuarse en tal caso de manera cromosómica o extracromosómica. Preferentemente, la inserción de los constructos de ácido nucleico se efectúa de manera cromosómica. Una integración "cromosómica" es la inserción de un fragmento de ADN al cromosoma de una célula huésped.

Por "endógeno" se entienden informaciones genéticas que ya están contenidas en el genoma de tipo silvestre (como se definió arriba).

Por "exógeno" se entienden informaciones genéticas como, por ejemplo, genes que no están contenidos en el genoma de tipo silvestre. Sí las informaciones genéticas exógenas, por ejemplo las unidades de expresión que contienen promotores múltiples, se introducen al genoma de una cepa de tipo silvestre, generando por medio de esto una cepa genéticamente modificada, entonces estas informaciones genéticas son endógenas en comparación de la cepa genética inicialmente generada con su descendencia, por lo contrario exógena una comparación con la cepa de tipo silvestre original la cual no contenía estas informaciones genéticas.

Por el término "genes" respecto de la regulación de la transcripción mediante ácidos nucleicos de la invención con actividad de promotor se entienden preferentemente ácidos nucleicos que contienen una región a transcribirse, es decir, por ejemplo, una región que regula la traducción, una región codificante, así como opcionalmente otros elementos de regulación como, por ejemplo, un terminador.

Por el término "genes" respecto de la regulación de la expresión mediante las unidades de expresión de la expresión se entienden preferentemente ácidos nucleicos que contienen una región codificantes, así como opcionalmente otros elementos de regulación, como por ejemplo un terminador.

Por una "región codificante" se entiende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína.

Por "heterólogo" respecto de ácidos nucleicos con actividad de promotor y genes se entiende que los genes usados en el tipo silvestre no se transcriben regulando los ácidos nucleicos con actividad de promotor, sino que surge un nuevo enlace funcional que no se presenta en el tipo silvestre y la combinación funcional de ácido nucleico con actividad de promotor y gen específico no se presenta en el tipo silvestre.

Por "heterólogo" respecto de unidades de expresión y genes se entiende que los genes usados no se expresan en el tipo silvestre regulando las unidades de expresión de la invención, sino que se produce un nuevo enlace funcional que no se presenta en el tipo silvestre, y la combinación funcional de la unidad de expresión de la invención y el gen especifico no ocurren en el tipo silvestre.

Los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de productos de química fina, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

Los genes se seleccionan preferiblemente de: ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de dioles, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de compuesto aromático, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de enzimas, ácidos nucleicos que codifican una proteína del metabolismo central, en cuyo caso los genes opcionalmente pueden contener otros elementos de regulación.

Particularmente se prefieren las proteínas a partir de la vía de biosíntesis de aminoácidos seleccionados, a saber:

Aspartato cinasa, aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, diaminopimelato-deshidrogenasa, diaminopimelato-decarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato - reductasa, glicerinaldehído-3-fosfato-dehidrogenasa, 3-fosfoglicerato-cinasa, piruvato-carboxilasa, triosefosfato-isomerasa, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, malato-quinona-oxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato-deshidrognasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metilen-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-cinasa, treonina-sintasa, treonina-exportador-portador, treonina-deshidratasa, piruvato-oxidasa, lisina-exportador, biotina-ligasa, cisteína-sintasal, cisteína-sintasa II, metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, actividad de metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, sulfatadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxin-sulfito-reductasa,

ferredoxin NADP reductasa, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, regulador RXA00655, regulador de RXN2910, arginil-ARN-t sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, treonina Efflux-proteína, serinhidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-afosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructocinasa, 6-fosfofructocinasa, tetrahidropicolinato-succinilasa, succinilo-aminocetopimelato-aminotransferasa, succinil-diaminopimelato-desuccinilasa, diaminopimelato-epimerasa, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, glucosafosfato-isomerasa, fosfoglicerato-mutasa, enolasa, piruvato-cinasa, aspartato-transaminasa, malato-enzima.

Proteínas y ácidos nucleicos que codifican estas proteínas son secuencias de proteína o secuencias de ácido nucleico de origen microbiano, preferentemente de bacterias del género Corynebacterium o Brevibacterium, preferiblemente de bacterias corineformes, particularmente preferible de Corynebacterium glutamicum.

Ejemplos de secuencias de proteínas particularmente preferidas y de secuencias de ácidos nucleicos correspondientes que codifican estas proteínas a partir de la vía de biosíntesis de aminoácidos, su documento de referencia y su denominación en el documento de la referencia se listan en la tabla 1:

Tabla 1

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. en el documento de referencia
Aspartato de cinasa	ask o lysC	EP1108790	ADN: 281 Proteína: 3781
Aspartato-semialdehído-deshidrogenasa	asd	EP1108790	ADN:331 Proteína: 3831
Dihidrodipicolinato-Sintetasa	dapA	WO 0100843	ADN: 55 Proteína: 56
Dihidrodipicolinato-Reductasa	dapB	WO 0100843	ADN: 35 Proteína: 36
Meso-diaminopimelato-D-deshidrogenasa	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Proteína : 6944
Diaminopicolinato-Decarboxilasa	lysA	EP1108790	ADN:3451 Prot.:6951
Exportador de Lisina	lysE	EP1108790	ADN: 3455 Prot.: 6955
Tetrahidropicolinato-Succinilasa	dapD	EP1108790	DNA : 1229 Prot : 4729
Succinilo-aminocetopimelato-Aminotransferasa	dapC	WO 0100843	DNA : 327 Prot: 328
Succinilo-Diaminopimelato-Desuccinilasa	dapE	WO 0100843	ADN: 31 Prot: 32
Diaminopimelato-Epimerasa	dapF	EP1108790	ADN:2131 Prot: 5632
Arginilo-ARN-t Sintetasa	argS	EP1108790	ADN: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-fosfat-Deshidrogenasa	zwf	WO 0100844	ADN: 243 Prot.: 244
Transcetolasa	RXA2739	EP 1108790	ADN: 1740 Prot: 5240
Transaldolasa	RXA2738	WO 0100844	ADN: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	ADN: 79 Prot: 80
6-Fosfogluconolactonasa	RXA2735	WO 0100844	ADN: 1 Prot.: 2
6-Fosfogluconato-Deshidrogenasa		EP1108790	ADN:1605 Prot: 5105
Glucosefosfato-Isomerasa	gpi	WO 0100844	ADN: 41 Prot.: 42
Malato-Quinona-Oxodoreductasa	mqo	WO 0100844	ADN: 569 Proteína: 570

(continuación)

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. en el documento de referencia
Glicerinaldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa	gap	WO 0100844	ADN: 187 Prot.: 188
3-Fosfogliceratcinasa	pgk	WO 0100844	ADN: 69 Prot.: 70
Triosefosfato-Isomerasa	tpi	WO 0100844	ADN: 61 Prot.: 62
1-Fosfofructocinasa 1	pfk1	WO0100844	ADN: 55 Proteína: 56
1-Fosfofructocinasa 2	pfk2	WO0100844	ADN: 57 Proteína: 58
6-Fosfofructocinasa 1	6-pfk1	EP 1108790	ADN: 1383 Proteína: 4883
6-Fosfofructocinasa 2	6-pfk2	DE 10112992	ADN: 1 Proteína: 2
Fructose-1,6-bisfosfatasa 1	fbr1	EP1108790	ADN: 1136 Proteína: 4636
Piruvato Oxidasa	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Proteína: 86
Fosfoglicerato-mutasa		WO 0100844	ADN: 49 Prot.: 50
Enolasa	eno	WO 0100844	ADN: 71 Prot.: 72
Piruvato-Cinasa	pykA	WO 0100844	ADN: 75 Prot.: 76
Piruvato-Cinasa	pykA	EP1108790	ADN: 3328 Prot.: 6828
Piruvato-Carboxilasa	pycA	EP1108790	ADN: 765 Prot.: 4265
Aspartato-Transaminasa		EP1108790	ADN: 3226 Prot: 4726 ADN: 3134 Prot.: 6634 ADN: 2861 Prot.: 6361 ADN: 911 Prot.: 4411
PEP-Carboxilasa	pck	EP1108790	ADN: 3470 Prot.: 6970
Malato-Enzima	malE	EP1108790	ADN: 3328 Prot: 6828
Biotina-Ligasa	birA	EP1108790	ADN: 786 Prot.: 4286
Homoserina Cinasa	thrB	WO 0100843	ADN: 173 Prot.: 174
Treonina Sintasa	thrC	WO 0100843	ADN: 175 Prot.: 176
Exportador portador de Treonina	thrE	WO 0251231	ADN: 41 Prot.: 42
Treonina Efflux Proteína	RXA2390	WO 0100843	ADN: 7 Prot.: 8
Treonina Dehidratasa	ilva	EP 1108790	ADN: 2328 Prot.: 5828
Homoserina-O-Acetiltransferasa	metA	EP 1108790	ADN:727 Prot: 4227
Cistationina-gammasintasa	metB	EP 1108790	ADN:3491 Prot: 6991
Cistationina-beta-Liasa	metC	EP 1108790	ADN:2535 Prot: 6035

(continuación)

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. en el documento de referencia
Metionina-Sintasa dependiente de coenzima B12, -	metH	EP 1108790	ADN:1663 Prot: 5163
O-Acetilhomoserina-Sulfhidrilasa	metY	EP 1108790	ADN:726 Prot: 4226
Metilentetrahidrofolat-Reductasa	metF	EP 1108790	ADN:2379 Prot: 5879
D-3-Fosfoglicerato-Deshidrogenasa	serA	EP 1108790	ADN:1415 Prot: 4915
Fosfoserina-Fosfatasa 1	serB	WO 0100843	ADN: 153 Prot.: 154
Fosfoserina-Fosfatasa 2	serB	EP 1108790	ADN: 467 Prot: 3967
Fosfoserina-Fosfatasa 3	serB	EP 1108790	ADN: 334 Prot.: 3834
Fosfoserina-Aminotransferasa	serC	WO 0100843	ADN: 151 Prot.: 152
Serina Acetil-Transferasa	cysE	WO 0100843	ADN: 243 Prot.: 244
Cisteína-Sintasa I	cysK	EP 1108790	ADN: 2817 Prot.: 6317
Cisteína Sintasa II	CysM	EP 1108790	ADN: 2338 Prot.: 5838
Homoserina-Deshidrogenasa	hom	EP 1108790	ADN: 3452 Prot.: 6952
Metionina-Sintasa independiente de coenzima B12	metE	WO 0100843	ADN:755 Prot.: 756
Serina-Hidroximetiltransferasa	glyA	WO 0100843	ADN: 143 Prot.: 144
Proteína en reducción de sulfato	RXA247	EP 1108790	ADN: 3089 Prot.: 6589
Proteína en reducción de sulfato	RXA248	EP 1108790	ADN: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadeniltransferasa Subunidad 1	CysN	EP 1108790	ADN: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadeniltransferasa Subunidad 2	CysD	EP 1108790	ADN: 3093 Prot.: 6593
Fosfoadenosina Fosfosulfato Reductasa	CysH	WO 02729029	ADN: 7 Prot.: 8
Ferredoxina-Sulfito-Reductasa	RXA073	WO 0100842	ADN: 329 Prot.: 330
Ferredoxina NADP Reductasa	RXA076	WO 0100843	ADN: 79 Prot.: 80
Regulador transcripcional LuxR	luxR	WO 0100842	ADN: 297 Proteína: 298
Regulador transcripcional LysR1	lysR1	EP 1108790	ADN: 676 Proteína: 4176
Regulador transcripcional LysR2	lysR2	EP 1108790	ADN: 3228 Proteína: 6728
Regulador transcripcional LysR3	lysR3	EP 1108790	ADN: 2200 Proteína: 5700
Regulador RXA00655	RXA655	US2003162267.2	ADN: 1 Prot.: 2
Regulador RXN02910	RXN291 0	US2003162267.2	ADN: 5 Prot.: 6

De los genes listados arriba se selecciona preferiblemente el gen G objetivo a regular.

Otras secuencias de proteínas particularmente preferidas a partir de la vía de biosíntesis de aminoácidos tienen en cada caso la secuencia de aminoácido indicada en la tabla 1 para esta proteína, donde la proteína respectiva tiene, en al menos una de las posiciones del aminoácido indicadas en la tabla 2, columna 2 para esta secuencia del aminoácido, otro aminoácido proteinogénico, diferente del respectivo aminoácido indicado en la tabla 2, columna 3 en el mismo renglón. En otra modalidad preferida las proteínas tienen, en al menos una de las posiciones del aminoácido indicadas en la tabla 2, columna 2 para la secuencia del aminoácido, el aminoácido indicado en la tabla 2, columna 4 en el mismo renglón. Las proteínas indicadas en la tabla 2 son proteínas mutadas de la vía de biosíntesis de los aminoácidos, que tienen propiedades particularmente ventajosas y, por lo tanto, son particularmente adecuadas para expresar los ácidos nucleicos correspondientes a través de un constructo promotor de la invención y para la producción de aminoácidos. Por ejemplo, la mutación T3111 conduce a desactivación de la inhibición-feedback (retroalimentación) de ask.

Los ácidos nucleicos correspondientes que codifican una proteína de la tabla 2, mutada, descrita previamente, puede prepararse por métodos usuales.

Como punto de partida para la preparación de las secuencias de ácido nucleico, que codifican una proteína mutada es adecuado, por ejemplo, el genoma de una cepa de Corynebacterium glutamicum que puede obtenerse de la American Type Culture Collection bajo la denominación ATCC 13032 o las secuencias de ácido nucleico referidas en la tabla 1. Para la re-traducción de la secuencia de aminoácidos de las proteínas mutadas en las secuencias de ácido nucleico que codifican estas proteínas, es ventajoso utilizar el codon usage del organismo al cual se introducirá la secuencia del ácido nucleico o en el cual está presente la secuencia del ácido nucleico. Por ejemplo, es ventajoso utilizar el codon usage de Corynebacterium glutamicum para Corynebacterium glutamicum. El codon usage del respectivo organismo puede comprobarse de una forma conocida per se a partir de bases de datos o de solicitudes de patente que describen al menos una proteína y un gen que codifica esta proteína a partir del organismo deseado.

Los datos en la tabla 2 han de entenderse de la siguiente manera:

En la columna 1 "Identificación" se expone una denominación unívoca para cada secuencia respecto de la tabla 1.

En la columna 2 "AS-POS" el número respectivo se refiere a la posición de aminoácido de la secuencia de polipéptido correspondiente de la Tabla 1. Un "26" en la columna "AS-POS" significa por consiguiente la posición de aminoácido 26 de la secuencia de polipéptido indicada de manera correspondiente. La numeración de la posición empieza en la terminal N en +1.

En la columna 3 "AS-tipo silvestre", la letra respectiva designa el aminoácido – representado en código de una letra en la posición indicada en la columna 2, en la cepa correspondiente de tipo silvestre de la secuencia de la Tabla 1.

En la columna 4 "AS-Mutante", la letra respectiva designa el aminoácido – representado en el código de una letra – en la posición indicado en la columna 2 en la cepa mutante correspondiente.

En la columna 5 "Función" se presenta la función fisiológica de la secuencia de polipéptido correspondiente.

Para una proteína mutada con una función determinada (columna 5) y una secuencia determinada de aminoácido de partida (Tabla 1), en las columnas 2, 3 y 4 se describe al menos una mutación, y también varias mutaciones se describen para algunas secuencias. Estas varias mutaciones se refieren siempre a la secuencia de aminoácido inicial más cercana anterior respectiva (tabla 1). El término "al menos una de las posiciones del aminoácido" de una secuencia del aminoácido determinada significa preferiblemente al menos una de las mutaciones descritas para esta secuencia del aminoácido en las columnas 2, 3 y 4.

Código de una letra de los aminoácidos proteinogénicos:

A Alanina	I Isoleucina	Q Glutamina
C Cisteína	K Lisina	R Arginina
D Aspartato	L Leucina	S Serina
E Glutamato	M Metionina	T Treonina
F Fenilalanina	N Asparagina	V Valina
G Glicina	P Prolina	W Triptofano

H Histidina Y Tirosina

Tabla 2

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Identificación	AS Posición	AS tipo silvestre	AS Mutante	Función
ask	317	S	A	Cinasa de aspartato
	311	T	I	
	279	A	T	
asd	66	D	G	Aspartato-Semialdehído-Deshidrogenasa
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihidrodipicolinato Sintetasa
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihidrodipicolinato-Reductasa
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelato-D-Dehidrogenasa
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinato-Decarboxilasa
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginilo-ARN-t-Sintetasa
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	

(continuación)

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Identificación	AS Posición	AS tipo silvestre	AS Mutante	Función
zwf	8	S	T	Glucosa-6-Fosfato-Dehidrogenasa
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glicerinaldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa
pycA	7	S	L	Piruvato-Carboxilasa
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	
	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxilasa
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserina Cinasa
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Treonina Sintasa
	478	T	I	

(continuación)

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Identificación	AS Posición	AS tipo silvestre	AS Mutante	Función
RXA330	85	I	M	Treonina-Efflux Proteína
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserina-Deshidrogenasa
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	regulador transcripcional LysR1 1
lysR3	142	R	W	regulador transcripcional LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transcetolasa
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolasa
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartato-1-Decarboxilasa
	33	G	S	6- Fosfogluconolactonasa

Microorganismos modificados genéticamente

Los casetes de expresión anteriormente descritos se introducen en bacterias corineformes mediante métodos conocidos por el trabajador experto, tal como la conjugación o electroporación (como por ejemplo Liebl et al (1989) FEMS Microbiology Letters 53, 299-303).

La selección de casetes de expresión integrados se efectúa preferentemente mediante el método SacB. El método SacB es conocido por el experto en la materia y se describe, por ejemplo, en Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and K19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Julio 22;145(1):69-73 y Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6): 1447-57.

De acuerdo con la invención, se prefiere usar como microorganismos de inicio aquellos que producen ya el producto valioso deseado (producto de química fina/proteína).

La invención por lo tanto también se refiere a una bacteria corineforme genéticamente modificada que contiene un casete de expresión o un vector que comprende el casete de expresión.

La presente invención se relaciona de manera particularmente preferible a bacterias corineformes genéticamente modificadas, en particular bacterias corineformes, las cuales contienen un vector, principalmente un vector transportador o vector de plásmido, que porta al menos un casete de expresión.

Bacterias corineformes son bacterias del género Corynebacterium, principalmente de las especies Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium acetoglutamicum, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium thermoaminogenes, Corynebacterium melassecola y Corynebacterium efficiens o del género Brevibacterium, principalmente de las especies Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum y Brevibacterium divaricatum.

Bacterias particularmente preferidas de los géneros Corynebacterium y Brevibacterium se seleccionan del grupo de Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870, Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539, Corynebacterium melassecola ATCC 17965, Corynebacterium efficiens DSM 44547, Corynebacterium efficiens DSM 44548. Corynebacterium efficiens DSM 44549, Brevibacterium flavum ATCC 14067, Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869, Brevibacterium divaricatum ATCC 14020, Corynebacterium glutamicum KFCC10065 y Corynebacterium glutamicum ATCC 21608, así como cepas que se derivan de las mismas, por ejemplo mediante mutación y selección clásica o mediante mutación dirigida.

La abreviatura KFCC significa Korean Federation of Culture Collection (Federación Coreana de Colección de Cultivos), la abreviatura ATCC significa American type strain culture collection (Colección de Cultivos Tipo Americano), y la abreviación DSM (o DSMZ) significa Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Deutsche Sammlung van Mikroorganismen and Zellkulturen).

Otras bacterias particularmente preferidas adicionales del género Corynebacterium y Brevibacterium se listan en la tabla 3:

Tabla 3

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							

(continuación)

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							

(continuación)

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							

(continuación)

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujiokense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							
Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							

(continuación)

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							
Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							

(continuación)

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						

(continuación)

Bacteria		Número de depósito							
Género	especie	ATCC	FERM	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCT C	DSM Z
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Las abreviaturas tienen el siguiente significado:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA

FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japón

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, EUA

CECT: Coleccion Española de Cultivos Tipo, Valencia, España

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, Reino Unido

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL (Holanda)

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK (Reino Unido)

DSMZ: Deutsche Sammlung de Mikroorganismen y Zellkulturen, Brunswick, Alemania

Aquí se prefieren particularmente microorganismos de las bacterias del género Corynebacterium, principalmente aquellas que ya son capaces de producir L-lisina, L-metionina y/o L-treonina. Estas son principalmente corine-bacterias en las que, por ejemplo, el gen que codifica una aspartato cinasa (gen ask) está desregulado o está eliminada o reducida la inhibición feedback (de retroalimentación). Por ejemplo, tales bacterias tienen una mutación en el gen ask, que conduce a una reducción o a una eliminación de la inhibición feedback (de retroalimentación) tal como, por ejemplo, la mutación T311I.

Las unidades de expresión permiten regular las vías metabólicas hacia productos biosintéticos específicos en las bacterias corineformes genéticamente modificadas anteriormente descritas de acuerdo con la invención.

Para este propósito, las vías metabólicas que conducen hacia un producto biosintético específico, por ejemplo, se refuerzan provocando o aumentando la velocidad de transcripción o la velocidad de expresión de los genes de esta

vía biosintética en la que la elevada cantidad de proteína conduce a una actividad total incrementada de estas proteínas de la vía biosintética deseada y, de esta manera, hacia un flujo metabólico reforzado hacia el producto biosintético deseado.

Además, las vías metabólicas que no conducen a un producto biosintético específico pueden atenuarse reduciendo la velocidad de transcripción o la velocidad de expresión de genes de esta vía biosintética divergente en la que la cantidad reducida de proteína conduce a una actividad total reducida de estas proteínas de la vía biosintética no deseada y, de esta manera, adicionalmente a un flujo metabólico reforzado hacia el producto biosintético deseado.

Las bacterias corineformes genéticamente modificadas de la invención son capaces, por ejemplo, de producir productos biosintéticos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón, celulosa o de glicerina y etanol.

La invención, por lo tanto, se refiere a un proceso para producir productos biosintéticos cultivando las bacterias corineformes genéticamente modificadas de la invención.

Dependiendo del producto biosintético deseado, la velocidad de transcripción o la velocidad de expresión de diferentes genes debe aumentarse o reducirse. Por lo regular es ventajoso modificar la velocidad de transcripción o la velocidad de expresión de varios genes; es decir, aumentar la velocidad de transcripción o la velocidad de expresión de una combinación de genes y/o reducir la velocidad de transcripción o la velocidad de expresión de una combinación de genes.

En las bacterias corineformes genéticamente modificadas de la invención, al menos una velocidad de transcripción o velocidad de expresión modificada, es decir incrementada o reducida, de un gen puede atribuirse a una unidad de expresión.

Otras velocidades de expresión modificadas adicionales, es decir adicionalmente aumentadas o adicionalmente reducidas, de otros genes en la bacteria corineforme genéticamente modificada pueden, aunque no tienen que, originarse en las unidades de expresión.

La invención, por lo tanto, se refiere además a un proceso para producir productos biosintéticos cultivando bacterias corineformes genéticamente modificadas de la invención.

V. Campos de aplicación de la invención

Los casetes de expresión y los vectores pueden (utilizarse), por ejemplo, de manera particularmente ventajosa en procesos mejorados para la producción por fermentación de productos biosintéticos, tal como se describe a continuación.

Los casetes de expresión que comprenden unidades de expresión, que contienen promotores múltiples, tienen principalmente la ventaja de permitir una modulación de la expresión del gen estructural enlazado funcionalmente.

Los casetes de expresión que comprenden unidades de expresión pueden utilizarse para modificar, es decir aumentar o reducir, o para provocar la velocidad de expresión de genes en microorganismos, en comparación con los de tipo silvestre. Esto proporciona la posibilidad, en el caso de un aumento en la velocidad de expresión, de maximizar la expresión del gen en cuestión. Eligiendo una unidad de expresión adecuada, sin embargo, la expresión también puede efectuarse a una intensidad que está por debajo del valor máximo que puede obtenerse mediante otra unidad de expresión, pero la cual al mismo tiempo libera el producto de expresión en una cantidad más compatible para el microorganismo que se está expresando. Esto es particularmente ventajoso si son tóxicas concentraciones demasiado altas del producto de expresión para el microorganismo que se está expresando. Las unidades de expresión de la invención permiten de esta manera, mediante selección entre unidades de expresión con intensidad de expresión respectivamente diferente, la regulación fina de la expresión a un valor óptimo, principalmente en el caso de expresión a largo plazo.

Además, los casetes de expresión que comprenden unidades de expresión pueden servir para regular y reforzar la formación de productos biosintéticos diferentes, como por ejemplo productos de química fina, proteínas, principalmente aminoácidos, en microorganismos, principalmente especies de Corynebacterium.

VI. Productos biosintéticos y métodos de producción preferidos

Los productos biosintéticos preparados de acuerdo con la invención son productos de química fina.

El término "producto de química fina" es corriente para el experto en la materia e incluye compuestos que se producen por un organismo y son utilizados en diversas ramas de la industria, tales como, por ejemplo, aunque sin restringirse a, la industria farmacéutica, agrícola, de cosméticos, de alimentos y comida para animales. Estos compuestos comprenden ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido láctico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido itacónico y ácido diaminopimélico y aminoácidos, tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, bases de purina y bases de pirimidina, nucleósidos y nucleótidos (como se describe por ejemplo en Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, páginas 561-612, en Biotechnology volumen 6, Rehm et al., editores VCH: Weinheim y las citas allí contenidas), lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados (por ejemplo, ácido araquidónico), dioles (por ejemplo, propandiol y butandiol), carbohidratos (por ejemplo, ácido hialurónico y trehalosa), compuestos aromáticos (por ejemplo, aminas aromáticas, vanilina e índigo), vitaminas y cofactores (tal como se describen en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, volumen A27, "Vitamins", páginas 443-613 (1996) VCH: Weinheim y las citas allí contenidas; y Ong, A.S., Niki, E. y Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, celebrada 1.-3. Sept. 1994 en Penang, Malasia, AOCS Press (1995)), Enzimas y todas los otros químicos descritos por Gutcho (1983) en Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 y las referencias bibliográficas allí indicadas.

Productos biosintéticos particularmente preferidos se seleccionan del grupo de ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos y nucleósidos, aminoácidos, tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, enzimas y proteínas.

Ácidos orgánicos preferidos son ácido láctico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido itacónico y ácido diaminopimélico.

Nucleósidos y nucleótidos preferidos se describen preferiblemente en Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, páginas 561-612, en Biotechnology volumen 6, Rehm et al., editores VCH: Weinheim y las citas allí contenidas.

Los productos biosintéticos preferidos son, además, lípidos, ácidos grasos saturados y no saturados tal como, por ejemplo, el ácido araquidónico, dioles tales como, por ejemplo, propandiol y butandiol, carbohidratos tales como, por ejemplo, el ácido hialurónico y trehalosa, compuestos aromáticos tales como, por ejemplo, aminas aromáticas, vanilina e índigo vitaminas y cofactores como se describe, por ejemplo, en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, volumen A27, "Vitamins", páginas 443-613 (1996) VCH: Weinheim y las citas allí contenidas; y Ong, A.S., Niki, E. y Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, celebrada en 1.-3. Sept. 1994 en Penang, Malasia, AOCS Press (1995)), enzimas policétidos (Cane et al. (1998) Science 282: 63-68), y todos los otros productos químicos descritos por Gutcho (1983) en Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 y las referencias bibliográficas allí citadas.

Productos biosintéticos particularmente preferidos son aminoácidos, de manera particularmente preferida aminoácidos esenciales, principalmente L-glicina, L-alanina, L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptófano, L-lisina, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-serina, L-prolina, L-valina, L-isoleucina, L-cisteína, L-tirosina, L-histidina, L-arginina, L asparagina, ácido L-aspártico y L-treonina, L-homoserina, principalmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. En lo sucesivo, por un aminoácido como, por ejemplo, lisina, metionina y treonina se entiende aquí respectivamente la forma L y D del aminoácido, preferiblemente la forma L, es decir, por ejemplo L-lisina, L-metionina y L-treonina.

En las secciones siguientes se describe más exactamente la producción de lisina, de metionina y de treonina, que se prefieren particularmente.

a) Producción de lisina

La invención se refiere principalmente a un proceso para producir lisina cultivando bacterias corineformes genéticamente modificadas con velocidad de expresión aumentada o provocada de al menos un gen en comparación con el de tipo silvestre, donde

- la expresión de al menos un gen en la bacteria corineforme se causa o se modifica introduciendo a la bacteria corineforme un casete de expresión de la invención, el cual comprende el gen.

Los genes se seleccionan aquí en particular de entre ácidos nucleicos que codifican un aspartato cinasa, ácidos nucleicos que codifican un aspartato semialdehido dehidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un diaminopimelato deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un diaminopimelato descarboxilasa, ácidos nucleicos que codifican un dihidrodipicolinato sintetasa, ácidos nucleicos que codifican un dihidrodipicolinato reductasa, ácidos nucleicos que codifican una gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, ácidos nucleicos que

codifican una 3-fosfoglicerato cinasa, ácidos nucleicos que codifican una piruvato carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una triosafosfato isomerasa, ácidos nucleicos que codifican un regulador transcripcional LuxR, ácidos nucleicos que codifican un regulador transcripcional LysR1, ácidos nucleicos que codifican un regulador transcripcional LysR2, ácidos nucleicos que codifican un malato quinona oxidoreductasa, ácidos nucleicos que codifican una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos trancetolasa, ácidos nucleicos que codifican una transaldolasa, ácidos nucleicos que codifican un exportador de lisina, ácidos nucleicos que codifican una biotina ligasa, ácidos nucleicos que codifican un arginil-ARNt sintetasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoenolpiruvato carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una fructosa-1,6-bifosfatasa, ácidos nucleicos que codifican un proteína OpcA, ácidos nucleicos que codifican una 1-fosfofructocinasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfofructocinasa, ácidos nucleicos que codifican una tetrahidropicolinato succinilasa, ácidos nucleicos que codifican una succinil aminocetopimelato aminotransferasa, ácidos nucleicos que codifican una succinil diaminopimelato desuccinilasa, ácidos nucleicos que codifican una diaminopimelato epimerasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfogluconato deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una glucosa fosfato isomerasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoglicerato mutasa, ácidos nucleicos que codifican una enolasa, ácidos nucleicos que codifican una piruvato-cinasa, ácidos nucleicos que codifican una aspartato-transaminasa y ácidos nucleicos que codifican una malato-enzima.

Otra forma de realización preferida del proceso descrito previamente para producir lisina se caracteriza porque las bacterias corineformes genéticamente modificadas en comparación con el tipo silvestre presenta una actividad elevada, al menos una de las actividades seleccionadas entre:

Actividad de aspartato-cinasa, actividad de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, actividad de diaminopimelato-deshidrogenasa, actividad de diaminopimelato-decarboxilasa, actividad de dihidrodipicolinato-sintetasa, actividad de dihidridipicolinato-reductasa, actividad de glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa, actividad de 3-fosfoglicerat-cinasa, actividad de piruvato carboxilasa, actividad de triosafosfato-isomerasa, actividad del Regulador transcripcional LuxR, actividad del regulador transcripcional LysR1, actividad del regulador transcripcional LysR2, actividad de malato-quinona-oxodoreductasa, actividad de glucosa-6-fosfato-deshidrogneasa, actividad de 6-fosfogluconato-deshidrogneasa, actividad de transcetolasa, actividad de transaldolasa, actividad de exportador de lisina, actividad de arginilo-ARN-t-sintetasa, actividad de fosfoenolpiruvato-carboxilasa, actividad de fructosa 1,6-bifosfatasa, actividad de la proteína OpcA, actividad de la 1-fosfofructocinasa, actividad de la 6- fosfofructocinasa, actividad de biotina ligasa, y actividad de tetrahidropicolinato succinilasa, actividad de succinil aminocetopimelato aminotransferasa, actividad de succinil diaminopimelato desuccinilasa, actividad de diaminopimelato epimerasa, actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa, actividad de glucosa fosfato isomerasa, actividad de fosfoglicerato mutasa, actividad de enolasa, actividad de piruvato cinasa, actividad de aspartato transaminasa y actividad de enzima de malato.

Otra modalidad particularmente preferida del proceso descrito anteriormente para producir lisina se caracteriza porque las bacterias corineformes genéticamente modificadas que tienen, en comparación con el tipo silvestre, adicionalmente una actividad reducida, de al menos una de las actividades seleccionadas del grupo de actividad de treonina deshidratasa, actividad de homoserina O- acetiltransferasa, actividad de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, actividad de fosfoenolpiruvato carboxicinasa, actividad de piruvato oxidasa, actividad de homoserina cinasa, actividad de homoserina deshidrogenasa, actividad del exportador de treonina, actividad de proteína de efflux-treonina, actividad de asparaginasa, actividad de aspartato descarboxilasa y actividad de treonina sintasa.

b) Producción de metionina

La invención se refiere además a un proceso para producir metionina cultivando bacterias corineformes genéticamente modificadas con velocidad de expresión incrementada o provocada de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre, en cuyo caso

- la expresión de al menos un gen en la bacteria corineforme se provoca o se modifica introduciendo en las bacterias corineformes un casete de expresión que comprende el gen.

Los genes se seleccionan aquí principalmente entre ácidos nucleicos que codifican una aspartato cinasa, ácidos nucleicos que codifican un aspartato semialdehido deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un homoserina deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un glicerinaldehido-3-fosfato deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un 3- fosfoglicerato cinasa, ácidos nucleicos que codifican un piruvato carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican un triosafosfato isomerasa, ácidos nucleicos que codifican un homoserina O-acetiltransferasa, ácidos nucleicos que codifican una cistahionina gamma-sintasa, ácidos nucleicos que codifican una cistahionina beta liasa, ácidos nucleicos que codifican una serina hidroximetiltransferasa, ácidos nucleicos que codifican una O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, ácidos nucleicos que codifican una metilenotetrahidrofolato reductasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoserina aminotransferasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoserina fosfatasa, ácidos nucleicos que codifican una serina acetil transferasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad de cisteína cintasa I, ácidos nucleicos que codifican una actividad de cisteína sintasa II, ácidos nucleicos que codifican una actividad de metionina sintasa dependiente de la coenzima B 12, ácidos nucleicos que codifican una actividad de

metionina sintasa independiente de la coenzima B-12, ácidos nucleicos que codifican una actividad de un sulfato adeniltransferasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad de una fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad de una ferredoxin sulfito reductasa, ácidos nucleicos que codifican un actividad de ferredoxin NADPH reductasa, ácidos nucleicos que codifican un actividad de ferredoxin, ácidos nucleicos que codifican un proteína de reducción RXA077 de sulfato, ácidos nucleicos que codifican un proteína de reducción de sulfato RXA248, ácidos nucleicos que codifican un proteína de reducción de sulfato RXA247, ácidos nucleicos que codifican un regulador RXA655 y ácidos nucleicos que codifican un regulador RXN2910. Ácidos nucleicos que codifican 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato cinasa, aspartato transaminasa o enzima de malato.

Otra modalidad preferida del proceso descrito anteriormente para producir metionina se caracteriza porque las bacterias corineformes genéticamente modificadas, en comparación con el tipo silvestre, tienen adicionalmente una actividad incrementada de al menos una de las actividades seleccionadas del grupo de actividad de aspartato cinasa, actividad de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, actividad de homoserina deshidrogenasa, actividad de glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa, actividad de 3-fosfoglicerato cinasa, actividad de piruvato carboxilasa, actividad de triosafosfato isomerasa, actividad de homoserina O-acetiltransferasa, actividad de cistahionina gamma-sintasa, actividad de cistahionina beta-liasa, actividad de serina-hidroximetiltransferasa, actividad de O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, actividad de metilen-tetrahidrofolato-reductasa, actividad de fosfoserina-aminotransferasa, actividad de fosfoserina-fosfatasa, actividad de serina acetil-transferasa, actividad de cisteína-sintasa, actividad de cisteína-sintasa II, actividad de de metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, actividad de metionina-sintasa independiente de coenzima B12, actividad de sulfato-adenililtransferasa, actividad de fosfoadenosina-fosfosulfato-reductasa, actividad de ferredoxina-sulfito-reductasa, actividad de ferredoxina NADPH-reductasa, actividad de ferredoxina, actividad de proteína de la reducción de sulfato RXA077, actividad de una proteína de la reducción de sulfato RXA248, actividad de una proteína de la reducción de sulfato RXA247, actividad de un regulador RXA655 y actividad de un regulador RXN2910, actividad de una 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, actividad de una glucosafosfato-isomerasa, actividad de una fosfoglicerato-mutasa, actividad de una enolasa, actividad de una piruvato-cinasa, actividad de una aspartato-transaminasa y actividad de la malato-enzima.

Otra modalidad particularmente preferida del método descrito anteriormente para producir metionina se caracteriza porque las bacterias corineformes genéticamente modificadas tienen adicionalmente, en comparación con el tipo silvestre, una actividad reducida, de al menos una de las actividades seleccionadas del grupo de actividad de homoserina cinasa, actividad de treonina deshidratasa, actividad de treonina sintasa, actividad de meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa, actividad de fosfoenolpiruvato carboxicinasa, actividad de piruvato oxidasa, actividad de dihidrodipicolinato sintasa, actividad de dihidropicolinato reductasa y actividad de diaminopicolinato descarboxilasa.

c) Producción de treonina

La invención se refiere además a un proceso para producir treonina cultivando bacterias corineformes genéticamente modificadas con velocidad de expresión incrementada o provocada de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre, en cuyo caso

- la expresión de al menos un gen en la bacteria corineforme se provoca o se modifica introduciendo a la bacteria corineforme un casete de expresión que comprende el gen.

Los genes se seleccionan aquí principalmente entre ácidos nucleicos que codifican un aspartato cinasa, ácidos nucleicos que codifican un aspartato semialdehido deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un 3- fosfoglicerato cinasa, ácidos nucleicos que codifican un piruvato carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una triosafosfato isomerasa, ácidos nucleicos que codifican una homoserina-cinasa, ácidos nucleicos que codifican una treonina sintasa, ácidos nucleicos que codifican un portador transportador de treonina, ácidos nucleicos que codifican una glucose-6-fosfato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una transaldolasa, ácidos nucleicos que codifican una transcetolasa, ácidos nucleicos que codifican una malato-quinona-oxidoreductasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un exportador de lisina, ácidos nucleicos que codifican una biotina-ligasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoenolpiruvato-carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una proteína Efflux de treonina, ácidos nucleicos que codifican una fructosa-1,6-bisfosfatasa, ácidos nucleicos que codifican una proteína OpcA, ácidos nucleicos que codifican una 1-fosfofructocinasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfofructocinasa, y ácidos nucleicos que codifican una homoserina-deshidrogenasa y ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, glucosafosfato-isomerasa, fosfoglicerato-mutasa, enolasa, piruvato-cinasa, aspartato-transaminasa y malato-enzima.

Otra modalidad preferida del método descrito previamente para producir treonina se caracteriza porque las bacterias corineformes genéticamente modificadas tienen adicionalmente, en comparación con el tipo silvestre, una actividad incrementada, de al menos una de las actividades seleccionadas del grupo:

actividad de aspartatocinasa, actividad de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, actividad de glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa, actividad de 3-fosfoglicerat cinasa, actividad de piruvato carboxilasa, actividad de triosafosfato isomerasa, actividad de treonina sintasa, actividad de un portador transportador de treonina, actividad de transaldolasa, actividad de transcetolasa, actividad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, actividad de malato-quinona-oxidoreductasa, actividad de homoserina-cinasa, actividad de biotina-ligasa, actividad de fosfoenolpiruvato-carboxilasa, actividad de proteína de efflux-treonina, actividad de proteína OpcA, actividad de 1-fosfofructocinasa, actividad de 6-fosfofructocinasa, actividad de fructosa 1,6-bisfosfatasa, actividad de 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, actividad de homoserina-deshidrogenasa, actividad de una 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, actividad de una glucosafosfato-isomerasa, actividad de una fosfoglicerato-mutasa, actividad de una enolasa, actividad de una piruvato-cinasa, actividad de una aspartato-transaminasa y actividad de la malato-enzima.

Otra modalidad particularmente preferida del proceso previamente descrito para producir treonina se caracteriza porque las bacterias corineformes genéticamente modificadas tienen adicionalmente, en comparación con el tipo silvestre, una actividad reducida, de al menos una de las actividades, seleccionadas del grupos de actividad de treonina – deshidratasa, actividad de homoserina O-acetiltransferasa, actividad de serina-hidroximetiltransferasa, actividad de O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, actividad de meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa, actividad de fosfoenolpiruvato-carboxicinasa, actividad de piruvato-oxidasa, actividad de dihidrodipicolinato sintetasa, actividad de dihidrodipicolinato reductasa, actividad de asparaginasa, actividad de aspartato-descarboxilasa, actividad de exportador de lisina, actividad de acetolactato-sintasa, actividad de ácido cetol reductoisomerasa, actividad de aminotransferasa de cadena ramificada, actividad de metionina sintasa dependiente de la coenzima B-12, actividad de metionina sintasa independiente de la coenzima B-12, actividad de dihidroxi ácido dehidratasa y actividad de diaminopicolinato descarboxilasa.

d) Otros datos sobre la producción de bioproductos según la invención

Estas actividades incrementadas o reducidas adicionales de al menos una de las actividades descritas anteriormente pueden, aunque no necesariamente, provocarse por una unidad de expresión de la invención o por un casete de expresión de la invención. Actividades de al menos una de las actividades previamente descritas pueden, pero no tienen que, ocasionarse por uno o por un casete de expresión.

Por el término "actividad" de una proteína se entiende, en el caso de una enzima, la actividad enzimática de la proteína correspondiente; en el caso de otras proteínas, como por ejemplo proteínas de estructura o de transporte, la actividad fisiológica de las proteínas.

Las enzimas por lo regular están en capacidad de transformar un sustrato a un producto o de catalizar este paso de transformación. Por consiguiente, por "actividad" de una enzima se entiende la cantidad convertida del sustrato o la cantidad formada de producto por parte de la enzima en un tiempo determinado.

En el caos de una actividad incrementada en comparación con el tipo silvestre se incrementa de esta manera la cantidad transformada de sustrato o la cantidad formada de producto por parte de la enzima, en comparación con el tipo silvestre en un tiempo determinado.

A manera de ejemplo, este incremento de la "actividad", en el caso de todas las actividades descritas antes y después, es de al menos 1 a 5 %, como por ejemplo de al menos 20 %, de al menos 50 %, de al menos 100 %, de al menos 300 %, o de al menos 500%, o de al menos 600 % de la "actividad del tipo silvestre".

En el caso de una actividad reducida en comparación con el tipo silvestre, se reduce la cantidad convertida de sustrato o la cantidad de producto formado por parte de la enzima en un tiempo determinado.

Por una actividad reducida se entiende preferentemente la supresión o bloqueo parcial o esencialmente total, basado en diferentes mecanismos biológicos celulares, de la funcionalidad de estas enzimas en un microorganismo.

Una reducción de la actividad comprende una disminución cuantitativa de una enzimas hasta una ausencia esencialmente completa de la enzimas (es decir, falta de detectabilidad de la correspondiente actividad o falta de detectabilidad inmunológica de la enzima). La actividad en el microorganismo se reduce en comparación con el tipo silvestre en al menos 5 %, como al menos 20 %, al menos 50 %, o en aproximadamente 100 %. "Reducción" también significa principalmente la falta total de la actividad correspondiente.

La actividad de determinadas enzimas en microorganismos genéticamente modificados así como en el tipo silvestre y de esta manera el incremento o la reducción de la actividad enzimática pueden determinarse de acuerdo con métodos conocidos, como por ejemplo ensayos enzimáticos.

Un incremento adicional de actividades puede efectuarse de diferentes manera, por ejemplo desconectando mecanismos de regulación inhibitorios a nivel de expresión o de proteína o incrementando la expresión del gen de ácidos nucleicos que codifican las proteínas previamente descritas en comparación con el tipo silvestre.

El incremento de la expresión del gen de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas descritas anteriormente frente al tipo nativo puede efectuarse igualmente de maneras diferentes, por ejemplo induciendo el gen mediante activadores o, como se describió anteriormente, incrementando la actividad de promotor o incrementando la actividad de expresión o introduciendo una o más copias del gen en el microorganismo.

Por aumento de la expresión del gen de un ácido nucleico que codifica una proteína también se entiende de acuerdo con la invención la manipulación de la expresión de las proteínas endógenas propias del microorganismo. Esto puede lograrse por ejemplo, como se describió anteriormente, modificando las secuencias de promotor de los genes, introduciendo una unidad de expresión para el control regulador de los genes y modificando las unidades de expresión introducidas. Una modificación tal, que tiene como consecuencia una velocidad de expresión incrementada del gen, puede efectuarse por ejemplo por eliminación o inserción de secuencias de ADN.

Es posible, tal como se describió previamente, modificar la expresión de las proteínas endógenas mediante la aplicación de estímulos exógenos. Esto puede efectuarse mediante condiciones fisiológicas particulares, es decir mediante la aplicación de sustancias externas.

Para lograr un incremento de la expresión del gen el experto en la materia puede adoptar otras medidas diferentes, de manera individual o en combinación. Así, por ejemplo, el número de copias de los genes correspondientes puede elevarse o la región de promotor y regulación, o el sitio de enlace ribosómico que se encuentra corriente arriba del gen estructural, puede mutarse. Adicionalmente es posible incrementar la expresión durante la producción fermentativa a través de promotores inducibles. Los procedimientos para prolongar el tiempo de vida del ARNm mejoran igualmente la expresión. Además, la actividad enzimática también se refuerza previniendo la degradación de la proteína de la enzima. Los genes o las constructos del gen pueden estar presentes en plásmidos con diferente número de copias o integrados y amplificados en el cromosoma. De manera alterna, también puede lograrse una sobreexpresión de los genes relevantes modificando la composición del medio y mediante el control del cultivo.

El experto en la materia encuentra instrucciones para esto, entre otras, en Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), en Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya y Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), en Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der EP-A-0472869, en US -A-4,601,893, en Schwarzer y Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991), en Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994), en LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), en la WO 96/15246, en Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), en la JP-A-10-229891, en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58,.191-195 (1998)), en Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) y en textos de enseñanza conocidos de genética y biología molecular.

Adicionalmente puede ser ventajoso para la producción de productos biosintéticos, principalmente L-lisina, L-metionina y L-treonina, junto con la expresión o intensificación de un gen, eliminar reacciones laterales no deseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumfanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

En una modalidad preferida, el incremento de la expresión del gen de un ácido nucleico que codifica una de las proteínas descritas anteriormente, se efectúa introduciendo al microorganismo al menos un ácido nucleico que codifica una proteína correspondiente. La introducción del ácido nucleico puede efectuarse de manera cromosómica o de manera extracromosómica, es decir, incrementando en el microorganismo huésped el número de copias en el cromosoma y/o una copia del gen sobre un plásmido que se replica.

La introducción del ácido nucleico, por ejemplo en la forma de un casete de expresión de la invención que comprende el ácido nucleico, preferiblemente se efectúa de manera cromosómica, principalmente por el método SacB descrito previamente. Es posible en principio usar para este propósito cualquier gen que codifica una de las proteínas descritas previamente.

En el caso de secuencias de ácidos nucleicos genómicos de fuentes eucariotas las cuales contienen intrones, si el microorganismo huésped es incapaz o no puede ser hecho capaz de expresar las proteínas correspondientes se prefiere usar secuencias de ácidos nucleicos las cuales ya han sido procesadas, tal como los ADNc correspondientes.

Ejemplos de genes correspondientes se listan en las tablas 1 y 2.

La reducción de las actividades descritas previamente en bacterias corineformes se efectúa preferentemente mediante al menos uno de los siguientes métodos:

• la introducción de al menos una secuencia de ácido ribonucleico sense (sentido) para inducir una cosupresión o de un casete de expresión que garantiza su expresión

• la introducción de al menos un factor de enlace de ADN o de proteína para un gen correspondiente, un ARN o una proteína o de un casete de expresión que garantiza su expresión

• la introducción de al menos una secuencia de ácido nucleico viral la cual provoca degradación de ARN o de un casete de expresión que garantiza su expresión

• la introducción de al menos un constructo para generar una pérdida de función, tal como, por ejemplo, la generación de stop-codones o desplazamientos en la estructura de lectura, de un gen, por ejemplo generando una inserción, eliminación, inversión o mutación en un gen. Preferiblemente pueden generarse mutantes knockout mediante inserción dirigida al gen objetivo deseado a través de la recombinación homóloga o de la introducción de nucleasas de secuencias especificas contra el gen objetivo.

• la introducción de un promotor con actividad de promotor reducida o de una unidad de expresión con actividad de expresión reducida.

• La introducción de un ARN antisense (de antisentido) que reduce la traslación del ARN sense (de sentido) (ARNm).

Para el experto en la materia es conocido que también pueden emplearse otros métodos en el contexto de la presente invención para reducir su actividad o función. Por ejemplo, también puede ser ventajosa la introducción de una variante negativa dominante de una proteína o de un casete de expresión que garantiza su expresión.

Además, cada uno de estos procesos individuales puede producir una reducción en la cantidad de proteína, la cantidad de ARNm y/o la actividad de una proteína. También es concebible una aplicación combinada. Otros métodos son conocidos por el experto en la materia y pueden comprender impedir o suprimir el procesamiento de la proteína, el transporte de la proteína o su ARNm, la inhibición de la adición del ribosoma, la inhibición de la unión del ARN, la inducción de una enzima que degrada el ARN y/o la inhibición o la terminación de la elongación de la traslación.

VII. Cultivo de bacterias corineformes y aislamiento de producto

En el proceso de la invención para producir productos biosintéticos, la etapa de cultivo de los microorganismos genéticamente modificados es preferiblemente seguida por un aislamiento los productos biosintéticos de los microorganismos y/o del caldo de fermentación. Estas etapas pueden tener lugar al mismo tiempo y/o preferiblemente después de la etapa de cultivo.

Las bacterias corineformes genéticamente modificados de la invención pueden cultivarse para producir productos biosintéticos, principalmente L-lisina, L-metionina, L-treonina, de manera continua o de manera discontinua en un proceso por lotes (cultivo por lote) o en procesos de alimentación por lotes o de alimentación por lotes repetidos. Un resumen de métodos de cultivo conocidos se encuentra en el libro de texto de Chemiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Tecnología de bioprocesos 1. Introducción a la tecnología de bioprocesos) (Editorial Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren y periphere Einrichtungen (Bioreactores y dispositivos periféricos) (editorial Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo a usarse debe satisfacer de una manera adecuada las exigencias de las cepas respectivas. Existen descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

Estos medios que pueden emplearse de acuerdo a la invención usualmente comprenden una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o microelementos.

Fuentes de carbono preferidas son los azúcares tales como los mono-, di- o polisacáridos. Ejemplos de fuentes de carbono muy buenas son la glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Los azucares pueden también ponerse en el medio a través de compuestos complejos tales como las melazas u otros subproductos de la refinación de azúcar. También puede ser ventajoso agregar mezclas de diversas fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son los aceites y las grasas tales como, por ejemplo, aceite de soya, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico, alcoholes tales como, por ejemplo, glicerina, metanol o etanol y ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido láctico.

Las fuentes de nitrógeno son usualmente compuestos de nitrógeno orgánicos e inorgánicos o materiales que contienen estos compuestos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno comprenden gas amoniaco o sales de amonio tales

como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno de complejas tales como agua de infusión de maíz, harina de soya, proteína de soya, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse de manera individual o como mezcla.

Los compuestos de sales inorgánicas los cuales pueden estar presentes en el medio comprenden las sales de cloruro, de fósforo, o sales sulfatos de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

Como fuentes de azufre para producir productos de química fina, principalmente metionina, pueden usarse compuestos inorgánicos tales como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetrationatos, tiosulfatos, sulfuros, pero también compuestos de azufre orgánicos tales como mercaptanos y tioles.

Como fuente de fósforo puede usarse ácido fosfórico, dihidrofosfato de potasio o hidrofosfato de dipotasio o las sales correspondientes que contienen sodio.

Pueden agregarse agentes formadores de quelatos al medio para mantener los iones metálicos en solución. Agentes formadores de quelatos particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles tales como catecol o protocatecuate o ácidos orgánicos tal como el ácido cítrico.

Los medios de fermentación empleados de acuerdo con la invención usualmente también contienen otros factores de crecimiento tales como vitaminas o promotores de crecimiento, a los cuales pertenecen por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotinico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales frecuentemente provienen de componentes complejos del medio, tales como extracto de levadura, melazas, agua de infusión de maíz, y similares. También pueden agregarse precursores adecuados al medio de cultivo. La composición exacta de los compuestos en el medio depende en gran medida del experimento respectivo y se decide de manera individual para cada caso específico. Información sobre la optimización del medio se puede obtener del manual "Applied Microbiol. Phisiology, A Practical Approach" (editores P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) páginas 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Medios de cultivo también pueden comprarse de proveedores comerciales, como Standard 1 (Merck) o BHI (Brain heart infusion, DIFCO) y similares.

Todos los componentes del medio se esterilizan ya sea con calor (20 min a 1,5 bar y 121°C) o mediante esterilización por filtración. Los componentes pueden esterilizarse ya sea juntos o sí es necesario de manera separada. Todos los componentes del medio pueden estar presentes al inicio del cultivo u opcionalmente pueden agregarse de manera continua o a manera de lotes.

La temperatura del cultivo está normalmente entre 15°C y 45°C, preferiblemente a 25°C hasta 40°C y puede mantenerse constante o modificarse durante el experimento. El pH del medio debe estar en el rango de 5 a 8,5, preferiblemente alrededor de 7,0. El pH para el cultivo puede controlarse durante el cultivo agregando compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o amoniaco acuoso o compuestos ácidos tales como ácido fosforito o ácido sulfúrico. El desarrollo de espuma puede controlarse empleando antiespumantes tales como, por ejemplo, esteres de poliglicol de ácido graso. La estabilidad de los plásmidos puede mantenerse agregando sustancias adecuadas al medio con una acción selectiva, tal como, por ejemplo, antibióticos. Las condiciones aeróbicas se mantienen introduciendo al cultivo oxígeno o mezclas de gas que contienen oxígeno, como por ejemplo aire de ambiente. La temperatura del cultivo es normalmente 20°C a 45°C. El cultivo se continúa hasta que la formación del producto deseado se encuentra al máximo. Este objetivo normalmente se alcanza dentro de 10 horas a 160 horas.

El contenido de materia seca de los caldos de fermentación obtenidos de esta manera es normalmente de 7,5 a 25% en peso.

Adicionalmente también es ventajoso realizar la fermentación con límite de azúcar al menos al final, pero en particular en al menos 30% del tiempo de fermentación. Esto quiere decir que la concentración de azúcar utilizable en el medio de fermentación se mantiene en 0 a 3 g/l, o se reduce, durante este tiempo.

Los productos biosintéticos se aíslan del caldo de fermentación y/o de los microorganismos de una manera conocida per se de acuerdo con las propiedades físicas/químicas del producto biosintético requerido y de los subproductos biosintéticos.

El caldo de fermentación puede procesarse a continuación, por ejemplo. Dependiendo del requerimiento, la biomasa puede retirarse totalmente o parcialmente del caldo de fermentación por métodos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos, o dejarse completamente en este.

A continuación, el caldo de fermentación puede espesarse o concentrarse por métodos conocidos tales como, por ejemplo, con la ayuda de un evaporador rotatorio, evaporador de película delgada, evaporador de película de caída, por osmosis inversa o por nanofiltración. A continuación, este caldo de fermentación concentrado puede procesarse por secado por congelamiento, secado por pulverización, granulación por pulverización o por otros métodos.

Sin embargo, también es posible seguir purificando los productos biosintéticos, especialmente la L-lisina, L-metionina y la L-treonina. Para este propósito, el caldo que contiene el producto se somete, después de la eliminación de la biomasa, a una cromatografía usando una resina adecuada, en cuyo caso el producto deseado o las impurezas se retienen total o parcialmente en la resina cromatográfica. Estas etapas cromatograficas pueden repetirse sí se requiere, en cuyo caso se usan resinas de cromatografía iguales o diferentes. El experto en la materia es hábil en la selección de resinas de cromatografía adecuadas y sus usos más efectivos. El producto purificado puede concentrarse por filtración o ultrafiltración y almacenarse a una temperatura a la cual la estabilidad del producto es máxima.

Los productos biosintéticos pueden resultar en diversas formas, por ejemplo en forma de sus sales o ésteres.

La identidad y pureza del (de los) compuesto (s) aislado(s) puede determinarse por técnicas del estado de la técnica. Estas comprenden cromatografía líquida a alta presión (HPLC), métodos espectroscópicos, métodos de teñido, cromatografía de capa delgada, NIRS, ensayos de enzima o ensayos microbiológicos. Estos métodos analíticos se resumen en: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; y Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) volumen A27, VCH: Weinheim, páginas 89-90, páginas 521-540, páginas 540-547, páginas 559-566, 575-581 y páginas 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volumen 17.

La invención se describe ahora en más detalle por medio de los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1:

Preparación del vector pCLiK5MCS

Primero la resistencia a la ampicilina y el origen de replicación del vector pBR322 se amplificaron con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores oligonucleótidos de SEQ NO:5 y SEQ ID: 6.

SEQ ID NO: 5:
5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACA G-3'

SEQ ID NO: 6:
5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC G-3'

Aparte de las secuencias complementarias para el pBR322, el cebador de oligonucleótido de SEQ ID NO: 5 comprende, en la dirección 5'-3', los sitios de corte para la endonucleasa de restricción SmaI, BarnHL, NheI, y AscI, y el cebador de oligonucleótido de SEQ ID NO: 6 comprende, en la dirección 5'-3', los sitios de corte para las endonucleasas de restricción XbaI, XhoI, NotI y DraI. La reacción PCR se lleva a cabo mediante un método estándar tal como el Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) con PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA). El fragmento de ADN obtenido, cuyo tamaño es aproximadamente de 2.1 kb, se purifica usando el Kit de Purificación de PCR, ADN, GFX™ y Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del proveedor. Los extremos romos del fragmento de ADN se ligan entre sí usando el Rapid DNA Ligation Kit (Rache Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transforma según los métodos estándar tal como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección sobre células que portan plásmido colocando en placas con sobre agar LB que contiene ampicilina (50 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN plásmido de un clon individual se aisló usando el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante y se verificó por digestión de restricción. El plásmido obtenido de esta forma recibe el nombre de pCLiK1.

A partir del plásmido pWLTl (Liebl et al., 1992) como plantilla para una reacción PCR, se amplificó un casete de resistencia a kanamicina usando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID N:7 y SEQ ID NO:8.

SEQ ID NO:7:

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:8

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

Aparte de las secuencias complementarias para pWLT1, el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO:7 contiene, en la dirección 5'-3', los sitios de corte para las endonuclesas de restricción Xbal, BamHI, Nhel, y el cebador de oligonucleótido de SEQ ID NO: 8 contiene, en la dirección 5'-3', los sitios de corte para las endonucleasas de restricción Ascl y Nhel. La reacción PCR se realiza según el método estándar tal como Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) usando polimerasa PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, EUA). El fragmento de ADN obtenido, cuyo tamaño es aproximadamente de 1,3 kb, se purificó usando el GFX™PCR y Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. El fragmento de ADN se cortó mediante las endonucleasas de restricción Xbal y AscI (New England Biolabs, Beverly, EUA) y nuevamente se purificó a continuación usando GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. El vector pCLiK1 se cortó igualmente con las nucleasas de restricción Xbal y AscI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) según indicaciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (cerca de 2,1kb) con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante con el fragmento PCR cortado y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB Agar que contiene ampicilina (50 μg/ml) y kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN plásmido de un clon individual se aisló usando el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según indicaciones del fabricante y se verificó por digestión de restricción. El plásmido obtenido de esta manera recibe el nombre de pCLiK2.

El vector pCLiK2 se cortó con la endonucleasa de restricción Dral (New England Biolabs, Beverly, EUA). Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló un fragmento de vector con un tamaño de cerca de 2,3 kb con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se re-ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón según métodos estándar tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de un clon individual se aisló con el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según indicaciones del fabricante y se verificó por digestión de restricción. El plásmido obtenido obtiene el nombre de pCLiK3.

A partir de plásmido pWLQ2 (Liebl et al., 1992) como planilla para una reacción PCR se amplificó el origen de replicación pHM1519 con cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:9:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:10:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

Junto a las secuencias complementarias a pWLQ2, los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 contienen sitios de corte para la nucleasa de restricción NotI. La reacción PCR se realizó según método estándar como Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) con PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, EUA). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aproximadamente 2,7 kb se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. El fragmento de ADN se cortó con la endonucleasa de restricción NotI (New England Biolabs, Beverly, EUA) y a continuación a esto nuevamente se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. El vector pCLiK3 se cortó igualmente con la endonucleasa de restricción NotI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) según indicaciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (cerca de 2,3kb) con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante con el fragmento de PCR cortado y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, como los descritos en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante cultivo en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de un clon individual se aisló con el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según indicaciones del fabricante y se verificó por digestión de restricción. El plásmido obtenido de esta manera obtiene el nombre de pCLiK5.

Para la ampliación de pCLiK5 en un "multiple cloning site" (MCS) ambos oligonucleótidos sintéticos, en gran medida complementarios, de SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, que contienen sitios de corte para las nucleasas de restricción SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, SalI, ClaI, BamHI, XbaI y SmaI, se fusionan mediante calentamiento conjunto a 95°C y enfriamiento lento para producir un fragmento de ADN bicatenario.

SEQ ID NO:11:
5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCGGTACCACGCGTCATAT GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTTAAAT-3'

SEQ ID NO:12:
5'-GATCATTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCG GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTTAAAT-3'

El vector pCLiK5 se cortó con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI (New England Biolabs, Beverly, EUA) y se desfosforiló con fosfatasa alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) según indicaciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (cerca de 5,0 kb) con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante con el fragmento de ADN sintético y la mezcla de ligazón se transformó, según métodos estándar como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EUA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de un clon individual se aisló con el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según indicaciones del fabricante y se verificó por digestión de restricción. El plásmido obtenido de esta manera recibe el nombre de pCLiK5MCS.

Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se fraccionaron y se evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCLiK5MCS se lista como SEQ ID NO:13.

Ejemplo 2:

Preparación del plásmido PmetA metA

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, el ADN cromosómico como plantilla y Pfu Turbo Polymerase (de la empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, tal como se describe en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó el gen metA que incluye la región 5' no codificante.

SEQ ID NO: 14

5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT -3'

y

SEQ ID NO: 15

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

El fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 1,3 kb de tamaño se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. A continuación, se escindió con las enzimas de restricción Asp718 y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) y el fragmento de ADN se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El vector pClik5MCS SEQ ID NO: 13 se cortó con las enzimas de restricción Asp718 y SpeI y se aisló un fragmento con un tamaño de 5 kb, después de la separación electroforética con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El fragmento de vector se ligó junto con el con el fragmento de PCR con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron Reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCLiK5MCS PmetA metA se lista como SEQ ID NO 16.

Ejemplo 3:

Preparación del plásmido pCLiK5MCS Psod metA

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO 17 y SEQ ID NO 18, del ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar como Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pares de bases de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) de la dismutasa de superóxido (Psod).

SEQ ID NO: 17

5'-GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG-3'

y

SEQ ID NO: 18

5’-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGGTAAAAAATCCTTTCG -3’

El fragmento de ADN obtenido se purificón con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

A partir del plásmido PmetA metA SEQ ID NO: 16 como plantilla para una reacción PCR, con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO: 19: y SEQ ID NO: 20: se amplificó una parte de metA.

SEQ ID NO: 19

5’-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3’

y

SEQ ID NO: 20

5’-CTGGGTACATTGCGGCCC -3’

El fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 470 pares de bases se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante.

En otra reacción PCR se emplearon como plantilla ambos fragmentos obtenidos arriba. En el transcurso de la reacción PCR, mediante las secuencias homólogas a metA introducidas con el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO: 18, se produce una adición de ambos fragmentos entre sí y un alargamiento para producir una cadena de ADN continua por la polimerasa empleada. El método estándar se modificó en el sentido que los cebadores de oligonucleótidos usados SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 20 solo se adicionan a la mezcla de reacción al inicio del segundo ciclo.

El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 675 pares de bases se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. A continuación se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Ncol (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. Después se purificó de la agarosa con GFX™CR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) el fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 620 pares de bases.

El plásmido PmetA metA SEQ ID NO 16: se escindió con las enzimas de restricción NcoI y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Después de separación electroforética en gel, un fragmento de metA de aproximadamente 0,7 kb de grande se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El vector pClik5MCS SEQ ID NO:13 se cortó con las enzimas de restricción Xhol y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se aisló un fragmento de 5 kb de grande después de separación electroforética con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El fragmento de vector se ligó junto con el fragmento de PCR y el fragmento de metA con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contienen kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCLiK5MCS PSODmetA se lista como SEQ ID NO: 21:.

Ejemplo 4:

Preparación del plásmido pCLiK5MCS P EF-TU metA

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO 22 y SEQ ID NO 23, el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en

cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar como Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pares de bases de la región 5' no codificante (región de promotor) de la dismutasa de superóxido (Psod).

SEQ ID NO: 22

5'-GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG -3'

y

SEQ ID NO: 23

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATTGTATGTCCTCCTGGAC -3'

El fragmento de ADN obtenido se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

A partir del plásmido PmetA metA SEQ ID NO: 16 como plantilla para una reacción PCR una parte de metA se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 24

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

y

SEQ ID NO: 25

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

El fragmento de ADN obtenido, de aproximadamente 470 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante.

En otra reacción PCR como plantilla se emplearon conjuntamente ambos fragmentos obtenidos arriba. Mediante las secuencias homólogas a metA introducidas con el cebador de oligonucléotido SEQ ID NO: 18, en el transcurso de la reacción PCR se produce una adición de ambos fragmentos entre sí y un alargamiento hacia una cadena de ADN continua mediante la polimerasa empleada. El método estándar se modifico en tal sentido que los cebadores de oligonucleótido usados SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 25 se agregan solamente con el inicio del segundo ciclo.

El fragmento de ADN amplificado, de aproximadamente 675 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. Después de esto, se escindió con las enzimas de restricción XhoI y NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación, el fragmento de ADN de un tamaño aproximado de 620 pares de base se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

El plásmido PmetA metA SEQ ID NO: 16 se escindió con las enzimas de restricción NcoI y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Después de separación electroforética en gel, un fragmento de metA, con un tamaño aproximado de 0,7 kb, se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El vector pClik5MCS SEQ ID NO: 13 se cortó con las enzimas de restricción XhoI y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se aisló un fragmento de 5 kb de grande después de separación electroforética en gel con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El fragmento de vector se ligó junto con el fragmento de PCR y el fragmento de metA con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of

Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCLiK5MCS P_EFTUmetA se lista como SEQ ID NO: 26.

Ejemplo 5:

Preparación del plásmido pCLiK5MCS Pgro metA

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO 27 y SEQ ID NO 28, el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar como Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pares de bases de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen GroES (Pgro).

SEQ ID NO: 27

5'-GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC -3'

SEQ ID NO :28

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGATGAATCCCTCCATGAG -3'

El fragmento de ADN obtenido se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. A partir del plásmido PmetA metA como plantilla, para una reacción PCR, se amplificó con los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO: 30 una parte de metA.

SEQ ID NO: 29

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

SEQ ID NO: 30

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

El fragmento de ADN obtenido, de aproximadamente 470 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante.

En otra reacción PCR ambos fragmentos obtenidos arriba se emplearon conjuntamente como plantilla. Mediante las secuencias homólogas a metA introducidas con el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO: 28, en el transcurso de la reacción PCR se produjo una adición de ambos fragmentos entre sí y un alargamiento hacia una cadena de ADEN continua mediante la polimerasa empleada. El método estándar se modifico en tal sentido que los cebadores de oligonucleótido usados SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 30 solo se adicionaron a la mezcla de reacción con el inicio del segundo ciclo.

El fragmento de ADN amplificado, de aproximadamente 675 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. Después de esto se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Ncol (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. Después, el fragmento de ADN con un tamaño aproximado de 620 pares de bases se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

El plásmido PmetA metA SEQ ID NO: 16 se escindió con las enzimas de restricción Ncol y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Después de separación electroforética en gel, un fragmento metA de aproximadamente 0,7 kb de grande se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El vector pClik5MCS SEQ ID NO: 13 se cortó con las enzimas de restricción Xhol y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se aisló un fragmento de 5 kb de grande después de separación electroforética en gel con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El fragmento de vector se ligó junto con el fragmento de PCR y el fragmento de metA, con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó

según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró un selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCLiK5MCS Pgro metA se lista como SEQ ID NO: 31.

Ejemplo 6:

Preparación del plásmido P EF-TS metA

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótidos BK 1849 (SEQ ID NO: 32) y BK 1862 (SEQ ID NO: 33), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (Empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, tal como se describe Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó el gen metA, que codifica la homoserina-O-acetiltransferasa.

BK 1849 (SEQ ID NO: 32)

5'- GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG -3'

y

BK 1862 (SEQ ID NO: 33)

5'-ATGCCCACCCTCGCGCC -3'

El fragmento de ADN obtenido, de un tamaño aproximado de 1134 bp, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

Con los cebadores de oligonucleótido Haf 26 (SEQ ID NO: 34) y Haf 27 (SEQ ID NO: 35), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (Empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar, como se describe en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 pares de bases de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen que codifica el factor de elongación TS.

Haf 26 (SEQ ID NO: 34)

5'-GAGAGGATCCCCCCCACGACAATGGAAC-3'

y

Haf 27 (SEQ ID NO: 35)

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATTACGGGGCGATCCTCCTTATG -3'

El fragmento de ADN obtenido, de aproximadamente 195 bp de grande se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

Los cebadores Haf 27 y BK 1862 contienen una secuencia que se solapa y son homólogos entre sí en su extremo 5'.

Los productos PCR obtenidos arriba se emplearon como plantilla para otra PCR en la que se utilizan los cebadores BK 1849 (SEQ ID NO: 32) y Haf 26 (SEQ ID NO: 34).

Con esta mezcla pudo amplificarse un fragmento de ADN que correspondía al tamaño esperado de 1329 bp. Esta fusión P EF-TS/metA se clonó luego por los sitios de corte de restricción BamHI y SalI en el vector pClik 5a MCS (SEQ ID NO: 13).

El fragmento de vector se ligó junto con el fragmento de PCR con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó, según métodos estándar como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante se designó con pClik 5a MCS P EF-TS metA (SEQ ID NO: 36).

Ejemplo 7:

Preparación del plásmido P EF-Tu pSOD metA (H473)

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótido BK 1753 (SEQ ID NO: 37) y BK 1754 (SEQ ID NO: 38), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, como en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó el terminador GroEL.

BK 1753 (SEQ ID NO: 37)

GGATCTAGAGTTCTGTGAAAAACACCGTG

BK 1754 (SEQ ID NO: 38)

GCGACTAGTGCCCCACAAATAAAAAACAC

El fragmento de ADN obtenido, de un tamaño aproximado de 77 bp, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante, se cortó con las enzimas de restricción XbaI y Bcu I y se purificó una vez más.

El vector pClik5MCS (SEQ ID NO: 13) se linealizó con la enzima de restricción XbaI y se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

El vector linealizado se ligó junto con el fragmento de PCR con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante se designó con H247 (SEQ ID NO: 39).

Este plásmido se trató con las enzimas de restricción BcuI y SalI y se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

Una PCR se realizó con los oligonucleótidos BK 1848 (SEQ ID NO: 40) y BK 1849 (SEQ ID NO: 41), el plásmido pClik5MCS Psod metA (SEQ ID NO: 21) como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene) según métodos estándar, tal como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications,

Academic Press. El fragmento amplificado tenía una longitud esperada de cerca de 1350 bp y se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante, se cortó con las enzimas de restricción Bcul y Sall y se purificó una vez más.

Este fragmento se ligó con el plásmido H247 (sitios de corte Bcul y Sall) con ayuda del Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante se denominó pG A4 (H344) y se listó bajo SEQ ID NO: 42.

SEQ ID NO: 40 (BK 1848)

GAGAACTAGTAGCTGCCAATTATTCCGGG

SEQ ID NO: 41 (BK 1849)

GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG

El plásmido pG A4 (SEQ ID NO: 42) se cortó con las enzimas de restricción Xhol y Bcul y se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

Construcción de H473:

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótido BK 1695 (SEQ ID NO: 43) y Haf16 (SEQ ID NO: 44), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (Empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar, tal como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 182 pares de bases de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen EF Tu (Peftu).

SEQ ID NO: 43 (BK1695)

GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG

SEQ ID NO: 44 (Haf16)

GAGAACTAGTGTGGCTACGACTTTCGCAGC

El fragmento de ADN obtenido, de un tamaño aproximado de 200 bp, Gse purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante, se cortó con las enzimas de restricción Xho I y Bcu I y se purificó una vez más.

Este fragmento se ligó con el plásmido pG A4 (H344) (sitios de corte Xhol y Bcul) con ayuda del Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, EUA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El plásmido obtenido se llamó pClik5MCS PeftuPsod metA (H473). Se lista bajo SEQ ID NO: 45. Contiene (de 5' a 3') un promotor Peftu, un unidad de expresión Psod y directamente a continuación el metA open reading frame.

Ejemplo 8:

Preparación del plásmido PsodPeftu metA (H505)

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO: 46 (Haf64) y SEQ ID NO: 47 (Haf65), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar, tal como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen EF Tu (Peftu).

SEQ ID NO: 46 (Haf64)

GAGAACTAGTGGCCGTTACCCTGCGAATG

SEQ ID NO: 47 (Haf65)

GCGCGAGGGTGGGCATTGTATGTCCTCCTGGACTTC

El fragmento de ADN obtenido, de aproximadamente 200 bp de tamaño, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

En una segunda PCR con los cebadores de oligonucleótidos BK1862 (SEQ ID NO: 48) y BK1849 (SEQ ID NO: 49) y el plásmido H344 (SEQ ID NO: 42) como plantilla, se amplificó el metA open reading frame, según métodos estándar, como se describe en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. El fragmento obtenido de aproximadamente 1140 bp de longitud se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

SEQ ID NO: 48 (BK1862)

ATGCCCACCCTCGCGCC

SEQ ID NO: 49 (BK1849)

GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG

En otra reacción PCR se emplearon conjuntamente ambos fragmentos obtenidos arriba como plantilla. Mediante secuencias homólogas a metA, introducidas con el cebador de oligonucleótido Haf 65 SEQ ID NO: 47, en el transcurso de la reacción PCR se produjo una adición de ambos fragmentos y un alargamiento hacia una cadena de ADN continua mediante la polimerasa empleada. El método estándar se modifico en tal sentido que los cebadores de oligonucleótidos usados Haf 64 y BK 1849 SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 49 solo se adicionaron a la mezcla de reacción con el inicio del segundo ciclo.

El fragmento de ADN amplificado, de aproximadamente 1350 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. A continuación, se escindió con las enzimas de restricción BcuI y SalI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación el fragmento de ADN de un tamaño aproximado de 1340 pares de bases se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg). Este fragmento contiene la unidad de expresión Peftu fusionada con el metA ORF (= fragmento de Peftu-metA).

Con los cebadores de oligonucleótidos BK 1697 (SEQ ID NO: 50) y Haf17 (SEQ ID NO:51), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN (longitud total: 193 bp, de estos 173 de pSOD) de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen SOD (Psod).

SEQ ID NO: 50 (BK 1697)

GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG

SEQ ID NO: 51 (Haf 17)

GAGAACTAGTTAGGTTTCCGCACCGAGC

El fragmento de ADN amplificado se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. Después de esto se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Bcul (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación el fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 180 pares de bases se purificó de agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) (= fragmento Psod).

El plásmido (H344) pG A4 SEQ ID NO: 42 se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Sall (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación el vector linealizado se purificó de agarosa con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

El vector linealizado se ligó con ambos fragmentos (fragmento Peftu-metA y fragmento Psod) con ayuda del Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pClik5MCS PsodPeftu metA se listó como SEQ ID NO: 52.

Ejemplo 9:

Preparación del plásmido pClik5MCS Pgro Psod metA (H472)

ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO: 53 (BK1701) y SEQ ID NO: 54 (Haf18), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), según métodos estándar, como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 175 Nt. Contiene 155 pares de bases de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen GRO EL (Pgro) y de a un sitio de corte de restricción en extremos 5' y 3' (Xhol o Bcul).

SEQ ID NO: 53 (BK1701)

GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC

SEQ ID NO: 54 (Haf018)

GAGAACTAGTATTTTGTGTGTGCCGGTTGTG

El fragmento de ADN obtenido, de un tamaño aproximado de 175 bp, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. Después de esto se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Bcul (Roche Diagnostics, Mannheim) y se purificó el fragmento de ADN con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El plásmido H344 (SEQ ID NO: 42) se cortó con las enzimas de restricción Xhol y Bcul y un fragmento con un tamaño de aproximadamente 6.4 kb después de la separación electroforética en gel se aisló con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El producto de PCR y el plásmido cortado H344 se ligaron con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, tal como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido preparando en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467.

• Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante contiene un promotor Pgro directamente seguido de una unidad de expresión Psod y el metA ORF. pCLiK5MCS PgroPsod metA (H472) se lista como SEQ ID NO: 55.

Ejemplo 10:

Preparación del plásmido PgroPsod Pefts metA (H501)

Con los cebadores de oligonucleótidos BK1782 (SEQ ID NO: 56) y Haf63 (SEQ ID NO: 57) y el plásmido pClik5MCS Pgro Psod metA (SEQ ID NO: 55 (H472)) como plantilla se realizó una PCR según métodos estándar, como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. El fragmento amplificado comprende aproximadamente 474 pares de bases y contiene un casete Pgro-Psod con un sitio de corte Acc651 en el extremo 3'. El fragmento de ADN obtenido se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. A continuación, se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Acc65I y el fragmento de ADN (333 pares de base) se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

SEQ ID NO: 56 (BK1782)

TCGAGAGATTGGATTCTTAC

SEQ ID NO: 57 (Haf 63)

TCTCGGTACCCCGCACCGAGCATATACATC

El plásmido H479 (SEQ ID NO: 58) contiene la unidad de expresión Pefts fusionada con el metA ORF. Se cortó con las enzimas de restricción Xhol y Acc651 (upstream directamente de Pefts) y un fragmento de aproximadamente 6.4 kb de grande se aisló después de separación electroforética en gel con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

A continuación, se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante con el fragmento de PCR (casete Pgro-Psod) y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido preparando en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante contiene los 3 promotores Pgro Psod y P EF-Ts fusionados con el metA ORF. pCLiK5MCS Pgro Psod Pefts metA (H501) se listó como SEQ ID NO: 59.

Ejemplo 11:

Preparación del plásmido Peftu Psod Pefts metA (H502)

Con los cebadores de oligonucleótidos BK1782 (SEQ ID NO: 56) y Haf63 (SEQ ID NO: 57) y el plásmido pClik5MCS Peftu Psod (SEQ ID NO: 45 (H473)) como plantilla, se realizó una PCR según métodos estándar, como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. El fragmento amplificado comprende aproximadamente 495 pares de bases y contiene un casete Peftu-Psod con un sitio de corte Acc65I en el extremo 3'. El fragmento de ADN obtenido se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. A continuación se escindió con las enzimas de restricción Xhol y Acc651 y el fragmento de ADN (354 pares de bases) se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

SEQ ID NO: 56 (BK1782)

TCGAGAGATTGGATTCTTAC

SEQ ID NO: 57 (Haf 63)

TCTCGGTACCCCGCACCGAGCATATACATC

El plásmido H479 (SEQ ID NO: 58) contiene la unidad de expresión Pefts fusionada con el metA ORF. Se cortó con las enzimas de restricción Xhol y Acc65I (upstream directamente de Pefts) y un fragmento de aproximadamente 6.4 kb de tamaño se aisló con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit después de separación electroforética en gel.

A continuación se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante con el fragmento de PCR (casete Peftu-Psod) y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido preparando en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante contiene las 3 secuencias regulatorias Peftu Psod y P EF -Ts fusionadas con el metA ORF. pCLiK5MCS Peftu Psod Pefts metA (H501) se listó como SEQ ID NO: 60.

Ejemplo 12:

Medición de las actividades de metA

La cepa Corynebacterium glutamicum ATCC13032 se transformó con los plásmidos pClik5 MCS, pClik MCS Psod metA, pClik MCS Peftu metA, pClik5 MCS Pefts metA, pClik5 MCS Peftu Psod metA, pClik5 MCS Psod Peftu metA, pClik5 MCS Pgro Psod meta, pClik5 MCS Pgro Psod Pefts metA, pClik5 MCS Peftu Psod Pefts metA de acuerdo con el método descrito (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303). La mezcla de transformación se preparó en placas de CM que contenían adicionalmente 20 mg/l de kanamicina para lograr una selección en células que contienen plásmido. Los clones resistentes a Kan se escogen y se aíslan.

Cepas de C. glutamicum, que contenían uno de estos constructos de plásmido se cultivaron en medio MMA ((40 g/l de sacarosa, 20 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/l KH_2PO_4, 1 g/l de K_2HPO_4, 0,25g/l de $MgSO_4$ x $7H_2O$, 54 g de Aces, 1 ml de $CaCl_2$ (10 g/l), 1 ml de protocatecoato (300 mg/10 ml), 1 ml de solución de microelementos (10 g/l de $FeSO_4$ x /H_2O, 10 g/l de $MnSO_4$ x H_2O, 2 g/l $ZnSO_4$ x 7 H_2O, 0,2 g/l de $CuSO_4$, 0,02 g/l de $NiCl_2$ x 6 H_2O),100 μg/l de vitamina B12, 0,3 mg/l de tiamina, 1mM de leucina, 1 mg/l de piridoxal HCl, 1 ml de biotina (100 mg/l), pH 7,0) a 30°C por una noche. Las células se centrifugaron a 4°C y se lavaron dos veces con búfer Tris-HCl frío (0,1%, pH 8,0). Después de centrifugación renovada las células se recogen en búfer de Tris-HCl frío (0,1%, pH 8,0) y se ajustó una OD_{600} de 160. Para la ruptura de células se transfirió 1 ml de esta suspensión de células a tubos de Ribolyser de 2 ml de la empresa Hibaid y se lisó tres veces por 30 s respectivamente en un Ribolyser de la empresa Hibaid a un ajuste de rotación de 6,0. El lisado se clarificó mediante centrifugación por 30 minutos a 15.000 rpm a 4°C en una centrífuga Eppendorf y el sobrenadante se transfirió a una nueva copa Eppendorf. El contenido de proteína se determinó según Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254.

La actividad enzimática de MetA se realizó como sigue. Las mezclas de reacción de 1 ml contenía 100 mM de búfer de fosfato de potasio (pH 7,5), 5mM de $MgCl_2$, 100 μM de acetil CoA, 5mM de L-homoserina, 500 μM de DTNB (reactivo de Ellmans) y extracto celular. El ensayo inició adicionando el lisado respectivo de proteína y se incubó a temperatura ambiente. Luego se registró una cinética a 412 nm por 10 min.

Los resultados se muestran en la Tabla 1a.

Tabla 1a

Cepa	Designación de constructo interna	Actividad específica [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	H356 (metZ)	3,1

(continuación)

Cepa	Designación de constructo interna	Actividad específica [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pCLiK5MCS Psod metA	H144	1308,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu metA	H146	1233,0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pefts metA	H479	2339,0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu Psod metA	H473	2308,1
ATCC 13032 pCLiK5MCS Psod Peftu metA	H505	2061,9
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro Psod metA	H472	1501,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro Psod Pefts metA	H501	1773,4
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu Psod Pefts metA	H502	2262,2

La actividad de MetA pudo modularse usando las diversas combinaciones de promotores/unidades de expresión.

Ejemplo 13:

Construcción de plásmido pCIS lysC

Para generar una cepa que produce lisina se realizó un intercambio alélico del gen lysC de tipo silvestre en Corynebacterium glutamicum ATCC13032. En tal caso se realizó un intercambio de nucleótido en el gen lysC, de modo que en la proteína resultante el aminoácido Thr se intercambió en la posición 311 por un Ile. A partir del ADN cromosómico de ATCC13032 como plantilla para una reacción PCR, lysC se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:62 con ayuda del Pfu-Turbo PCR Systems (Stratagene USA) según indicaciones del fabricante.

SEQ ID NO:61

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC-3'

SEQ ID NO:62

5'-CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

Se preparó ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. El fragmento amplificado se flanquea en su extremo 5' por un corte de restricción SalI y en su extremo 3' se flanquea por un corte de restricción MluI. Antes de la clonación el fragmento amplificado se digirió mediante estas dos enzimas de restricción y se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

El polinucleótido obtenido se clonó por los cortes de restricción SalI y MluI en pCLIK5 MCS integrativ SacB, llamado en lo sucesivo pCIS (SEQ ID NO: 63) y se transformó en E.coli XL-1 blue. Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 μg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190). El plásmido se aisló y se confirmó la secuencia de nucleótido mediante secuenciación. La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA

74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). El plásmido pCIS lysC obtenido se lista como SEQ ID NO:64.

Ejemplo 14:

Mutagénesis del gen lysC de C. glutamicum

La mutagénesis dirigida del gen lysC de C. glutamicum se realizó con el QuickChange Kit (empresa Stratagene/USA) según indicaciones del fabricante. La mutagénesis se realizó en el plásmido pCIS lysC, SEQ ID NO:64. Para el intercambio de thr 311 a 311 ile con ayuda del método Quickchange (Stratagene) se sintetizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

SEQ ID NO:65

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3'

SEQ ID NO:66

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3'

El empleo de estos cebadores en la reacción Quickchange conduce en el gen lysC SEQ ID NO:67 a un intercambio del nucleótido en posición 932 (de C a T). El intercambio de aminoácido resultante Thr311Ile en el gen lysC se confirmó después de la transformación en E.coli XL1-blue y la preparación de plásmido se confirmó por reacciones de secuenciación. El plásmido obtuvo la denominación pCIS lysC thr311ile y se lista como SEQ ID NO:68.

El plásmido pCIS lysC thr311ile se transformó en C. glutamicum ATCC13032 mediante electroporación, tal como se describe en Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303. Se describen modificaciones del protocolo en DE 10046870. La disposición cromosómica del locus lysC de transformantes individuales se verificaron con métodos estándar mediante southern blot e hibridación tal como se describe en Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. De esta manera se aseguró que los transformantes fueran aquellos que tienen integrado el plásmido transformado mediante recombinación homóloga en el lysC-Lokus. Después del crecimiento de tales colonias por una noche en medios que no contienen antibiótico, las células se ponen en placas en un medio de sacarosa-CM-agar (10% de sacarosa, 10 g/l de glucosa; 2,5 g/l de NaCl; 2 g/l de urea, 10 g/l de Bacto Peptone (empresa Difco); 10 g/l de extracto de levadura, 22,0 g/L de agar (Difco)) y se incuban a 30°C por 24 horas.

Puesto que la sacarosa que contiene el gen sacB en el vector pCIS lysC thr311ile se convierte en un producto tóxico, solo pueden crecer aquellas colonias que han eliminado el gen sacB mediante un segundo paso de recombinación homólogo entre el gen lysC de tipo silvestre y el gen mutado lysC thr311ile. Durante la recombinación homóloga puede eliminarse o bien el gen de tipo silvestre, o bien el gen mutado junto con el gen sacB. Si el gen sacB se retira junto con el gen de tipo silvestre, resulta un transformante mutado.

Las colonias que iban creciendo se recogieron y se investigaron para un fenotipo sensible a kanamicina. Los clones con el gen sacB eliminado deben, al mismo tiempo, presentar comportamiento de crecimiento sensible a la kanamicina. Tales clones sensibles a la Kan se prueban en un frasco agitador para su productividad de lisina. (véase ejemplo 19). Para comparación se cultivó ATCC13032 del C. glutamicum no tratado. Se seleccionaron los clones con una producción de lisina incrementada frente al control, se produjo ADN cromosómico y se amplificó y se secuenció la región correspondiente del gen lysC mediante una reacción PCR. Un clon así, con la propiedad de biosíntesis de lisina incrementada y mutación detectada en lysC en el sitio 932 se designó con ATCC13032 lysCfor.

Ejemplo 15:

Preparación del plásmido pCIS Peftu ddh

Se preparó ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO: 69 (Old38) y SEQ ID NO: 70 (Old 39), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 200 de la región 5' no codificante (región de la unidad de expresión) del gen EF Tu (Peftu).

SEQ ID NO: 69 (OId38)

ACATCCATGGTGGCCGTTACCCTGCGAAT

SEQ ID NO: 70 (Old 39)

TGTATGTCCTCCTGGACTTC

El fragmento de ADN obtenido de tamaño aproximado de 200 bp se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

En una segunda PCR con los cebadores de oligonucleótidos Old40 (SEQ ID NO: 71) y SEQ ID NO: 72 (Old 37) y ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 como plantilla, se amplificó el ddh open reading frame según métodos estándar, como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. El fragmento obtenido, de aproximadamente 1017 bp de longitud, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante.

OId40 (SEQ ID NO: 71)

GAAGTCCAGGAGGACATACAATGACCAACATCCGCGTAGC

Old 37 (SEQ ID NO: 72)

GAAACCACACTGTTTCCTTGC

En otra reacción PCR los dos fragmentos obtenidos arriba se emplearon conjuntamente como plantilla. Mediante las secuencias homólogas a Peftu introducidas con el cebador de oligonucleótido OId40 SEQ ID NO: 71, en el transcurso de la reacción PCR se produce una adición de ambos fragmentos entre sí y un alargamiento para producir una cadena de AD continua mediante la polimerasa empleada. El método estándar se modificó en tal sentido que los cebadores de oligonucleótidos usados OId37 y Old 38 (SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 69) solo se adicionaron a la mezcla de reacción con el principio del segundo ciclo.

El fragmento de ADN amplificado, de aproximadamente 1207 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. A continuación se escindió con las enzimas de restricción NcoI y XhoI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. Después el fragmento de ADN de aproximadamente 1174 pares de bases de tamaño se purificó de la agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg). Este fragmento contiene la unidad de expresión Peftu fusionada con el ddh ORF (= fragmento Peftu-ddh).

Con los cebadores de oligonucleótido Old 32 (SEQ ID NO: 73) y Old 33 (SEQ ID NO: 74), el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de la región 5' no codificante del gen ddh.

SEQ ID 73 (OId32)

ATCAACGCGTCGACACCACATCATCAATCAC

SEQ ID 74 (OId33)

ATCACCATGGGTTCTTGTAATCCTCCAAAATTG

El fragmento de ADN amplificado se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante. A continuación se escindió con las enzimas de restricción MluI y NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación el fragmento de ADN de aproximadamente 720 pares de bases de tamaño se purifico de la agarosa con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) (= fragmento 5' ddh).

El plásmido pCIS (SEQ ID NO: 63) se escindió con las enzimas de restricción MluI y XhoI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación se purificó de la agarosa el vector linealizado con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

El vector linealizado se ligó con ambos fragmentos (fragmento Peftu-ddh y fragmento 5' ddh) con ayuda del Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 mg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

La preparación del plásmido de ADN se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante pCIS Peftu ddh se lista como SEQ ID NO: 75.

Ejemplo 16:

Preparación de pCIS PeftuPsod ddh

Se preparó ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 77, el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 677 pares de bases de la región 5' del gen ddh (fragmento 5'ddh).

SEQ ID NO: 76 (CK461)

CCTGACGTCGCAATATAGGCAGCTGAATC

SEQ ID NO : 77 (CK466)

GCCCAATTGGTTCTTGTAATCCTCCAAAA

El fragmento de ADN obtenido se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. A continuación se separó con las enzimas de restricción AatII y MunI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación el fragmento de ADN de aproximadamente 661 pares de bases de tamaño se purificó de la agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg). El fragmento resultante contiene la región 5' del ddh-ORF.

A partir del plásmido P EF-Tu pSOD metA (H473) (SEQ ID 45) como plantilla para una reacción PCR, con los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:-78 y SEQ ID NO: 79 se amplificó un casete PeftuPsod.

SEQ ID NO: 78 (CK426)

CGCCAATTGTCGAGGGCCGTTACCCT

SEQ ID NO: 79 (CK463)

GCTACGCGGATGTTGGTCATGGGTAAA,4AATCCTTTCGTA

El fragmento de ADN obtenido, de aproximadamente 378 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante.

En una PCR siguiente se amplificó el ddh ORF. Para esto se preparó ADN cromosómico de C. Glutamicum ATCC 13032 según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO: 80 (CK464) y SEQ ID NO: 81 (CK467=, el ADN cromosómico como plantilla y polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 992 pares de bases (ddh-ORF) (fragmento ddh). El fragmento de ADN amplificado se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante.

SEQ ID NO: 80 (CK464)

TACGAAAGGATTTTTTACCCATGACCAACATCCGCGTAGC

SEQ ID NO: 81 (CK467)

AGACCCGGGTTAGACGTCGCGTGCGATCA

En otra reacción PCR ambos fragmentos obtenidos arriba (casete PeftuPsod y ddh-ORF) se emplearon conjuntamente como plantilla. Mediante las secuencias homólogas a Psod, introducidas con el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO: 80 (CK464), en el transcurso de la reacción PCR se produce una adición de ambos fragmentos entre sí y un alargamiento para producir una cadena de ADN continua mediante la polimerasa empleada. El método estándar se modificó en tal sentido que los cebadores de oligonucleótidos usados SEQ ID NO: 79 (CK426) y SEQ ID NO: 81 (CK467) se adicionan a la mezcla de reacción solo con el inicio del segundo ciclo. El fragmento de ADN amplificado, de aproximadamente 1359 pares de bases, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit según indicaciones del fabricante.

A continuación se escindió con las enzimas de restricción MunI y SmaI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó mediante electroforesis en gel. A continuación el fragmento de ADN de aproximadamente 1349 pares de bases de tamaño se purificó de la agarosa con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg). El fragmento resultante contiene (de 5' a 3') un promotor Peftu, una unidad de expresión Psod y directamente a continuación el ddh open reading frame (PeftuPsod ddh).

El vector pCIS se cortó con las endonucleasas de restricción AatII y SmaI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agar al 0,8%, el vector linealizado (aproximadamente 4.2 kb) se aisló con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim), según indicaciones del fabricante, con ambos fragmentos PCR cortados (5'ddh y PeftuPsod ddh) y la mezcla de ligazón se transformó según métodos estándar, como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), en E.coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA). Se logró una selección en células que portan plásmido mediante preparación en placas de LB agar que contiene kanamicina (20 mg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1:190).

El ADN de plásmido de clones individuales se aisló con el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según indicaciones del fabricante y se verificó por digestión de restricción. Se secuenciaron 2 plásmidos correctos. Se realizaron reacciones de secuenciación según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). El plásmido resultante pClik Peftu Psod ddh es adecuado para integrar con ayuda de 2 sucesos de recombinación sucesivas el casete PeftuPsod antes de ddh-ORF cromosómico. El plásmido pCIS PeftuPsod ddh se lista como SEQ ID NO: 82.

Ejemplo 17:

Generación de las cepas ATCC13032 lysCfor Peftu ddh y ATCC13032 lysCfor PeftuPsod ddh

Se transformaron células de la cepa E. coli Mn522 (empresa Stratagene, Amsterdam, Holanda) con uno de los plásmidos pCIS Peftu ddh y pCIS PeftuPsod ddh así como con el plásmido pTc15AcgIM según Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303. El plásmido pTc15AcgIM hace posible la metilación de DNA según el patrón de metilación de Corynebacterium glutamicum (DE 10046870). Mediante esta metilación se incrementa la estabilidad de los plásmidos pCIS Peftu ddh y pCIS PeftuPsod ddh en células de C. glutamicum. El ADN de plásmido se aisló a continuación de las células Mn522 según métodos estándar y con ayuda de electroporación se introdujo la cepa arriba descrita de Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 ask (fbr). De esta electroporación y de la selección subsiguiente en placas de CM con kanamicina (25 μg/ml) se obtuvieron varios transconjugantes. Para la selección en el segundo suceso de recombinación que debe conducir a la escisión del vector, se cultivaron estos transconjugantes en medio de CM por una noche sin kanamicina y a continuación para la selección se cultivó en placas de CM 10% de sacarosa. El gen sacB presente en el vector pCIS codifica la enzima Laevansucrase y al crecer en sacarosa conduce a la síntesis de laevan. Puesto que laevan es tóxico para C. glutamicum solo las células de C. glutamicum que han perdido el plásmido de integración por el segundo paso de recombinación pueden crecer en el medio que contiene sacarosa (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 clones resistentes a sacarosa se probaron en su sensibilidad a kanamicina. Para varios de los clones ensayados, además de la resistencia frente a sacarosa, también pudo detectarse una sensibilidad frente a kanamicina, lo cual se espera en la escisión deseada de las secuencias del vector. Por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) también se verificó si se había realizado la integración deseada de la unidad de expresión Peftu o PeftuPsod. Para esto, de la placa de agar se retiraron los clones respectivos con un palillo y se suspendieron en 100 μl de H_2O e hirvieron por 10 min a 95°C. Se emplearon 10 μl respectivamente de la solución obtenida como plantilla en la PCR. Como cebadores se usaron oligonucleótidos que son homólogos a la unidad de expresión a introducir y al gen ddh. Las condiciones de PCR se seleccionaron como sigue: desnaturalización previa: 5 min a 95°C; desnaturaliación: 30 s a 95°C; hibridación 30 s a 55°C; amplificación 2 min a 72°C; 30 ciclos; extensión final 5 min a 72°C. En la mezcla

con el ADN de la cepa de partida no pudo generarse un producto de PCR mediante elección de los oligonucleótidos. Solo , se esperaba una banda en caso de clones que han realizado mediante la segunda recombinación la integración de las unidades de expresión Peftu o PeftuPsod directamente en 5' del gen ddh. La integración exitosa de los clones aquí ensayados positivamente se confirmó además mediante análisis de Southern blot (según métodos estándar, como se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)). Para cada una de las cepas a generarse se realizaron en tal caso 2 hidrólisis diferentes con enzimas de restricción que permiten una diferenciación unívoca de la cepa de partida (ATCC13032 ask (fbr)) y la cepa deseada. Además, con ayuda de una sonda que es homóloga al gen de resistencia a kanamicina se confirmó que las cepas obtenidas no tienen genes-kanamicina en el cromosoma. De esta manera pudieron generarse las siguientes cepas:

ATCC13032 lysCfbr Peftu ddh

ATCC13032 lysCfbr PeftuPsod ddh

Todas estas cepas contienen ungen ask feedback-desregulado y producen, por lo tanto, lisina. Se diferencian exclusivamente por la unidad de regulación que controla la transcripción del gen ddh.

Ejemplo 18:

Efecto del refuerzo de ddh mediante promotor doble en la producción de lisina

Para investigar el efecto del gen ddh con ayuda de un promotor doble se investigaron las siguientes cepas para la producción de lisina:

ATCC13032 lysCfbr

ATCC13032 lysCfbr Peftu ddh

ATCC13032 lysCfbr Peftu Psod ddh

Para este propósito se cultivaron por 2 días a 30°C las cepas en placas de CM (10,0 g/L de D-glucosa, 2,5 g/L de NaCl, 2,0 g/L de urea, 10,0 g/L de Bacto Pepton (Difco), 5,0 g/L de Yeast Extract (Difco), 5,0 g/L de Beef Extract (Difco), 22,0 g/L de agar (Difco), se autoclavó (20 min. 121°C)). A continuación, se rasparon las células de la placa y se resuspendieron en solución salina. Para el cultivo principal se inocularon 10 ml de medio I y 0,5 g de $CaCO_3$ autoclavado (Riedel de Haen) en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con la suspensión de las células hasta una OD_{600} de 1,5 y se incubó por 40h en uno de tipo Infors AJ118 (empresa Infors, Bottmingen, Suiza) a 220 rpm. A continuación se determinó la concentración de la lisina secretada en el medio.

Medio I:

40g/l Sacarosa

60g/l Melaza (calculada respecto del 100% de contenido de azúcar)

10g/l $(NH_4)_2SO_4$

0.4g/l $MgSO_4*7H_2O$

0.6g/l KH_2PO_4

0.3mg/l Tiamina*HCl

1mg/l Biotina (de una solución madre esterilizada por filtración cuyo pH se ajustó a 8,0 con NH_4OH)

2mg/l $FeSO_4$

2mg/l $MnSO_4$

Se ajustó con NH_4OH a pH 7,8, se autoclavó (121 °C, 20 min).

Adicionalmente se agregó vitamina B12 (hidroxicobalamina, Sigma Chemicals) de una solución madre (200 μg/ml, esterilizada por filtración) hasta una concentración final de 100 μg/l

La determinación de la concentración de aminoácido se efectuó mediante cromatografía líquida de alta presión según Agilent en un sistema HPLC LC de Agilent 1100 Series. Una derivatización de las pre-columnas con orto-ftalaldehído permite la cuantificación de los aminoácidos formados, la separación de la mezcla de aminoácidos tiene lugar en una columna Hypersil AA (Agilent). El resultado de la investigación se representa en la siguiente tabla.

Cepa	Concentración de lisina relativa (%)
ATCC13032 lysCfbr	100
ATCC13032 lysCfbr Peftu ddh	102,9
ATCC13032 lysCfbr PeftuPsod ddh	106,9

LISTADO DE SENCUENCIAS

<110> BASF AG

<120> Promotores múltiples

<130> M/45256

<160> 84

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 177

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pGRO

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(177)

<223> secuencia de promotor si no se presenta promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(155)

<223> secuencia de promotor si se une un promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (70)..(75)

<223> region 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (165)..(172)

<223> secuencia putativa de enlazamiento de ribosoma

<400> 1

cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60

tctcgggggt agagtgccaa ataggttgtt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120

ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg attcatc 177

<210> 2

<211> 195

<212> DNA

<213> corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pEFTS

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(195)

<223> secuencia de promotor si no se presenta promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(178)

<223> secuencia de promotor si se une un promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (147)..(152)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (162)..(167)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (179)..(185)

<223> secuencia putativa de enlazamiento de ribosoma

<400> 2

```
ccccacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcatcg ccgtgggggc tttttgggca   60
gccagcccgc cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg  120
gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacataag  180
gaggatcgcc ccgta                                                  195
```

<210> 3

<211> 199

<212> DNA

<213> corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pEFTU

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(199)

<223> secuencia de promotor si no se presenta promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(176)

<223> secuencia de promotor si se une un promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (36)..(41)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (63)..(68)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (92)..(97)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (187)..(193)

<223> secuencia putativa de enlazamiento de ribosoma

<400> 3

ggccgttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa cgccgttgcc 60

cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct cagtcttcca 120

ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt agccaccacg 180

aagtccagga ggacataca 199

<210> 4

<211> 191

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pSOD

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(191)

<223> secuencia de promotor si no se presenta promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1)..(173)

<223> secuencia de promotor si se une un promotor adicional corriente abajo

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (65)..(70)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (86)..(92)

<223> región 10 putativa

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (175)..(181)

<223> secuencia putativa de enlazamiento de ribosoma

<400> 4

agctgccaat tattccgggc ttgtgacccg ctacccgata aataggtcgg ctgaaaaatt 60

tcgttgcaat atcaacaaaa aggcctatca ttgggaggtg tcgcaccaag tacttttgcg 120

aagcgccatc tgacggattt tcaaaagatg tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180

atttttacc c 191

<210> 5

<211> 52

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 6

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 6

tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 7

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 7

gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 8

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8

gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 9

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9

gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaa 34

<210> 10

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 10

gagagggcgg ccgctcaagt cggtcaagcc acgc 34

<210> 11

<211> 140

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 11

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60

tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120

tctagacccg ggatttaaat 140

<210> 12

<211> 140

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 12

gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60

tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120

aggcctctcg agatttaaat 140

<210> 13

<211> 4323

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Plásmido pCLiK5MCS

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (457)..(1248)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3840)..(4302)

<223> PsacB (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2418)..(3839)

<223> SacB (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1515)..(2375)

<223> Ori-EC (pMB) (complementario)

<400> 13

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120
tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg 1440
gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttcccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1920

ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 1980
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580

ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgttagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaa gcatgtaaat atcgttagac gtaatgccgt caatcgtcat ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca ctttttttcag tgtgtaatca 2880
tcgtttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240
gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatgcaa agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgcga cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660
tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcatc 3840
gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcggtctgc ttcttccagc cctcctgttt 3900
gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080
attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200

gcataaagtt gccttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260

taatagtgaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320

atc 4323

<210> 14

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 14

gcgcggtacc tagactcacc ccagtgct 28

<210> 15

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 15

ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

<210> 16

<211> 6349

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pCLiK5MCS PmetA metA

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1727)..(2518)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (4799)..(5920)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3791)..(4465)

<223> Ori-Ec (pMB) (komplementär)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2785)..(3645)

<223> orf1

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (42)..(177)

<223> PmetA

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (178)..(1311)

<223> metA

<400> 16

```
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac ctagactcac cccagtgctt     60
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg    120
tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccacccag aacaggcggt tattttcatg    180
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa    240
gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctggggtga ataccgcgta    300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac    360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggt cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac    420
tgcgtgatct gtaccaacgt catcggtggt tgcaacggtt ccaccggacc tggctccatg    480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta    540
aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggt    600
ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtacccaga aactgttggc    660
gcagctgctg ttcttgcagt ttctgcacgc gccagcgcct ggcaaatcgg cattcaatcc    720
gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc    780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt    840
```

ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaacccactc 900
ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttgga ctaccaagca 960
gacaagctag tacagcgttt cgacgccggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020
cgccacgaca ttggtcgcga ccgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgtcggccac 1200
gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaaatg gatcgcatcg tgaggaactt cttcagcctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagttcg 1320
gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380
agacccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1440
tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1680
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga 1740
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 1980
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2040
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg 2160
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2280
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg 2340
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460
tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc 2700
gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760
gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940
ggcgtttttc cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120

gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 3180
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 3240
cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 3360
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 3420
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3540
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg 3660
ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3720
aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 3840
cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900
acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960
ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020
cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcgc 4080
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200
aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260
ggtgcccgca ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320
gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380
cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4500
aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc 4560
tgttcgacac ccatcccgag ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620
gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680
ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg 4740
ttcaaaatcg cttgcccggt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800
gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920
cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcattgatc cggtgtatgc 4980
cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280
agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340
cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt 5400
tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460

caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520
tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580
ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640
gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700
gaaagaccca aacagtgagt acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt 5820
tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttccccc gtagggtctc 6000
tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060
accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6120
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240
gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300
gtcggtgccg ctggttgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

<210> 17

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 17

gagactcgag agctgccaat tattccggg 29

<210> 18

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 18

cctgaaggcg cgagggtggg catgggtaaa aaatcctttc g 41

<210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 19

cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 20

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 20

ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 21

<211> 6386

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pCLiK5MCS PSODmetA

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1752)..(2543)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (4824)..(5945)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2810)..(3670)

<223> Ori-Ec (pMB) (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3816)..(4490)

<223> orf1

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (6)..(196)

<223> Psod

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (197)..(1330)

<223> metA

<400> 21

tcgagagctg ccaattattc cgggcttgtg acccgctacc cgataaatag gtcggctgaa 60
aaatttcgtt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt 120
ttgcgaagcg ccatctgacg gattttcaaa agatgtatat gctcggtgcg gaaacctacg 180
aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat 240
cggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac gctgaaatcg cctatcaccg 300
ctggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgttctca tcgaacacgc 360
cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc ccggcaaagc 420
catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcggtggtt gcaacggttc 480
caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg ggtaatcgct tccccgccac 540
gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc gacgcactcg gcatcaccac 600
ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgc accctagagt gggccgcaat 660
gtacccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgcagtt tctgcacgcg ccagcgcctg 720
gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga 780
aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccaccgga ctcggcgccg cccgacgcat 840
cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca 900
aaagaacgaa aacccactcg gtccctaccg caagcccgac cagcgcttcg ccgtggaatc 960
ctacttggac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc gacgccggct cctacgtctt 1020
gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac cgcggaggcc tcaacaaggc 1080
actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtaccc 1140
ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat ctactggcaa tggcaaaaat 1200
cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc cgccaaatgg atcgcatcgt 1260

gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac ccttcgacct acatcgagtt 1320
ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg 1380
cgttaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa 1440
ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccgg atgaatgtca 1500
gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca 1560
gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 1620
tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 1680
tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag 1740
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 1800
agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 1860
tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc 1920
tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt 1980
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 2040
tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 2100
ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag 2160
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg 2220
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc 2280
gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca 2340
tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2400
gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg 2460
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct 2520
atcgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc 2580
gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg 2640
cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct 2700
ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat 2760
gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc 2820
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 2880
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2940
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 3000
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 3060
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 3120
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 3180
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 3240
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac 3300
acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3360
gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3420
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 3480
ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3540
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 3600

ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 3660
agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc 3720
cgcgtgattt tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta taatggtgtc atgaccttca 3780
cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg 3840
agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc 3900
tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa 3960
ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag 4020
gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cggtggcctg attcctcccc 4080
ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca 4140
gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg 4200
cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg 4260
cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg 4320
cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg 4380
gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat 4440
acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag 4500
tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 4560
ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca 4620
cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttcctcgctc acctgggcag agaaaatttc 4680
cagggcagca agacccgcga cttcgccagc gcttggatca aagacccgga cacggagaaa 4740
cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc 4800
tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg 4860
ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac 4920
gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 4980
tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040
tggctgcaac gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100
ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 5160
acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgatc tcaggcacag 5220
aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280
caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340
ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 5400
gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 5460
cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520
tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580
cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 5640
gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700
gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760
gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820
ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg 5880

aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg 5940

ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca 6000

gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct 6060

cttgaagctc tctaggggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 6120

cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc 6180

gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt 6240

ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 6300

ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact 6360

tgatcagcgg ccgctcgatt taaatc 6386

<210> 22

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 22

gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 23

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 23

cctgaaggcg cgagggtggg cattgtatgt cctcctggac 40

<210> 24

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 24

cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 25

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 25

ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 26

<211> 6394

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pCLiK5MCS P EFTUmetA

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1772)..(2563)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (4844)..(6965)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2830)..(3690)

<223> Ori-Ec (pMB) (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3836)..(4510)

<223> orf1

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (18)..(216)

<223> Peftu

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (217)..(1350)

<223> metA

<400> 26

tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga 60
aaatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct 120
gtgtgctcag tcttccaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga 180
aagtcgtagc caccacgaag tccaggagga catacaatgc ccaccctcgc gccttcaggt 240
caacttgaaa tccaagcgat cggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac 300
gctgaaatcg cctatcaccg ctggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat 360
gtcgttctca tcgaacacgc cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac 420
ttgctcggtc ccggcaaagc catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc 480
atcggtggtt gcaacggttc caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg 540
ggtaatcgct tccccgccac gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc 600
gacgcactcg gcatcaccac ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgc 660
accctagagt gggccgcaat gtacccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgcagtt 720
tctgcacgcg ccagcgcctg gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa 780
aacgaccacc actggcacga aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccaccgga 840
ctcggcgccg cccgacgcat cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa 900
cgcttcggca ccaaagccca aaagaacgaa aacccactcg gtccctaccg caagcccgac 960
cagcgcttcg ccgtggaatc ctacttggac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc 1020
gacgccggct cctacgtctt gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac 1080
cgcggaggcc tcaacaaggc actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta 1140
gataccgata ttttgtaccc ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat 1200
ctactggcaa tggcaaaaat cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc 1260
cgccaaatgg atcgcatcgt gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac 1320
ccttcgacct acatcgagtt ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg 1380
tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa 1440
atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg 1500
ctgaccccgg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa 1560
gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg 1620
gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg 1680
caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc 1740

tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg 1800
ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 1860
ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa 1920
gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct 1980
ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga 2040
ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 2100
cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac 2160
ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc 2220
cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 2280
gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga 2340
tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 2400
ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga 2460
agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga 2520
ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg 2580
ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc 2640
gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatcctc 2700
cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg 2760
gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc 2820
ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc 2880
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 2940
aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 3000
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc 3060
gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 3120
tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 3180
ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 3240
ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 3300
tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 3360
tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg 3420
ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa 3480
aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt 3540
ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 3600
tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt 3660
atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg 3720
cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta 3780
taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga 3840
tctctctgat gtcgcgctgg agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt 3900
gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag 3960
tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg 4020

tgctcggcca gcgccaggag gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg 4080
cggtggcctg attcctcccc ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga 4140
tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga 4200
ggcggctagg tcgcaaatgg cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt 4260
cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat 4320
gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg 4380
ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag 4440
aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca 4500
gggcgtcggc taacccccag tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg 4560
attcacgaga cattgacaca ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacacccatc 4620
ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttcctcgctc 4680
acctgggcag agaaaatttc cagggcagca agacccgcga cttcgccagc gcttggatca 4740
aagacccgga cacggagaaa cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc 4800
ccggtgccag tatgttgctc tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat 4860
tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc 4920
gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg tgaatccact 4980
gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag 5040
cagcccgaat atgcgcctgc tggctgcaac gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc 5100
tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc 5160
gtaccgctgg catgcccagc acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc 5220
tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg 5280
acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct 5340
tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt 5400
cctctggact gctccagggc gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac 5460
tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc 5520
ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc 5580
gccggactgt gaccgccaga cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg 5640
ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct 5700
ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag 5760
tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa 5820
agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg 5880
ctcgtggccg acaatcaatg aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa 5940
tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta 6000
aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt 6060
tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctaggggggg ctcacaccat aggcagataa 6120
cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc 6180
actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg 6240
cacaccccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga 6300
aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt 6360

tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6394

<210> 27

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 27

gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

<210> 28

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 28

cctgaaggcg cgagggtggg catgatgaat ccctccatga g 41

<210> 29

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 29

cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 30

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 30

ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 31

<211> 6372

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pCLiK5MCS PGroESmetA

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1735)..(2526)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (4807)..(5928)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2793)..(3653)

<223> Ori-EC (pMB) (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3799)..(4473)

<223> orf1

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3)..(179)

<223> Pgro

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (180)..(1313)

<223> metA

<400> 31

agcggcttaa agtttggctg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgctggc 60
actctcgggg gtagagtgcc aaataggttg tttgacacac agttgttcac ccgcgacgac 120
ggctgtgctg gaaacccaca accggcacac acaaaatttt tctcatggag ggattcatca 180
tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat gtctccaccg 240
aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt gaataccgcg 300
tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca 360
acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt 420
actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca 480
tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg 540
taaacgccga aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg 600
gtggttccat gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtaccca gaaactgttg 660
gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaatc ggcattcaat 720
ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat 780
ccggctgcaa cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgcccac ctcacctacc 840
gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac gaaaacccac 900
tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg gactaccaag 960
cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt cttgctcacc gacgccctca 1020
accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa tccatcaaag 1080
ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac cagcaagaac 1140
acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc cctgtcggcc 1200
acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac ttcttcagcc 1260
tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc taacatatga 1320
ctagttcgga cctagggata tcgtcgacat cgatgctctt ctgcgttaat taacaattgg 1380
gatcctctag acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag 1440
aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg 1500
acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga 1560
tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc 1620
tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaggatc 1680
tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt 1740
gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat 1800
gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgcag 1860
gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac 1920
gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac 1980
gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc 2040
ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg 2100
ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag 2160

cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat 2220
caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgag 2280
gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc 2340
ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg 2400
ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg 2460
ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct tcttgacgag 2520
ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat 2580
cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc 2640
gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacg 2700
ctagcggcgc gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 2760
cgcatcaggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 2820
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat 2880
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 2940
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc 3000
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 3060
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 3120
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 3180
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 3240
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 3300
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 3360
ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 3420
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3480
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 3540
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 3600
taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc 3660
ggccgcggcc gcgcaaagtc ccgcttcgtg aaaattttcg tgccgcgtga ttttccgcca 3720
aaaactttaa cgaacgttcg ttataatggt gtcatgacct tcacgacgaa gtactaaaat 3780
tggcccgaat catcagctat ggatctctct gatgtcgcgc tggagtccga cgcgctcgat 3840
gctgccgtcg atttaaaaac ggtgatcgga tttttccgag ctctcgatac gacggacgcg 3900
ccagcatcac gagactgggc cagtgccgcg agcgacctag aaactctcgt ggcggatctt 3960
gaggagctgg ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcgccag gaggacgcac agtagtggag 4020
gatgcaatca gttgcgccta ctgcggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga 4080
cggcgcgcaa aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgcag ccagccgcga gcgcgccaac 4140
aaacgccacg ccgaggagct ggaggcggct aggtcgcaaa tggcgctgga agtgcgtccc 4200
ccgagcgaaa ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcgag aattatcgcg 4260
atcgtggcgg tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaatg ccgcgtttcg tgtgccgtgg 4320
ccgcccagga cgtgtcagcg ccgccaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcgcgt 4380
cgaaaaagcg cacaggcggc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttgaa 4440

cgccccgtga gcggtaactc acagggcgtc ggctaacccc cagtccaaac ctgggagaaa 4500
gcgctcaaaa atgactctag cggattcacg agacattgac acaccggcct ggaaattttc 4560
cgctgatctg ttcgacaccc atcccgagct cgcgctgcga tcacgtggct ggacgagcga 4620
agaccgccgc gaattcctcg ctcacctggg cagagaaaat ttccagggca gcaagacccg 4680
cgacttcgcc agcgcttgga tcaaagaccc ggacacggag aaacacagcc gaagttatac 4740
cgagttggtt caaaatcgct tgcccggtgc cagtatgttg ctctgacgca cgcgcagcac 4800
gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcgag 4860
cacgtaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgctggg cacgcctgga aaaagcgcca 4920
gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcatctggct cattgatccg 4980
gtgtatgccg cagcaggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc aacgaccgag 5040
gaaatgaccc gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag ccgtggccac 5100
tgcactctcc gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc 5160
ctagctgatc ttatggaggt tgctcgcatg atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc 5220
tatgagcagg agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg 5280
gaagcaaaag cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgccgctga agcgtctgga 5340
gagctgatcg acggcgtccg tgtcctctgg actgctccag ggcgtgccgc ccgtgatgag 5400
acggcttttc gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta 5460
aaagacacca agggtcatcg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggcggtcgga 5520
ggaggccgtg agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt 5580
gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag 5640
agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca 5700
gaacgctgga aagacccaaa cagtgagtac gcccgagcac agcgagaaaa actagctaag 5760
tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt 5820
atgactgttg agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt 5880
agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca cttaaggtct gcgggcattg aacttccacg 5940
aggacgccga aagcttccca gtaaatgtgc catctcgtag gcagaaaacg gttcccccgt 6000
agggtctctc tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg 6060
gggctcacac cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac 6120
tgctcccaaa gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct tgccccgcgg 6180
aaatttcctc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaag cttctttcac cctaaattcg 6240
agagattgga ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccctgat cgcccttgcg 6300
acgttggcgt cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgctcg 6360
atttaaatct cg 6372

<210> 32

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1849

<400> 32

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 33

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1862

<400> 33

atgcccaccc tcgcgcc 17

<210> 34

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf 26

<400> 34

gagaggatcc cccccacgac aatggaac 28

<210> 35

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf 27)

<400> 35

cctgaaggcg cgagggtggg cattacgggg cgatcctcct tatg 44

<210> 36

<211> 6389

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> pCLiK5MCS P EF-TS metA

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1767)..(2558)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (4839)..(5960)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2825)..(3685)

<223> Ori-Ec (pMB) (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3831)-..(4505)

<223> Orf1

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1217)..(1411)

<223> P EF-TS (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (83)..(1216)

<223> metA (complementario)

<400> 36

```
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt     60
cggacctagg gatatcgtcg acttagatgt agaactcgat gtaggtcgaa gggttgtctt    120
cgtctgggga gatgaggctg aagaagttcc tcacgatgcg atccatttgg cggctttcgg    180
tgaggaaagc atcgtggccg acaggggata cgatttttgc cattgccagt agatttccca    240
ggtttctgga gaggtgttct tgctggtggt aggggtacaa aatatcggta tctacgcctg    300
cgacaaggac tggaactttg atggattcga gtgccttgtt gaggcctccg cggtcgcgac    360
caatgtcgtg gcggttgagg gcgtcggtga gcaagacgta ggagccggcg tcgaaacgct    420
gtactagctt gtctgcttgg tagtccaagt aggattccac ggcgaagcgc tggtcgggct    480
tgcggtaggg accgagtggg ttttcgttct tttgggcttt ggtgccgaag cgttcgtcga    540
tttctagttc gccacggtag gtgaggtggg cgatgcgtcg ggcggcgccg agtccggtgg    600
ctgggttgca gccggattcg tagtagttgc cttcgtgcca gtggtggtcg ttttcaatcg    660
ccttaatttg ggcggattga atgccgattt gccaggcgct ggcgcgtgca gaaactgcaa    720
gaacagcagc tgcgccaaca gtttctgggt acattgcggc ccactctagg gtgcgggcac    780
cacccatgga accaccaagt actgcggcga ccgtggtgat gccgagtgcg tcgaggaatt    840
gtttttcggc gtttacctga tcacgaatgg acgtggcggg gaagcgatta ccccagaaat    900
ttccatctgg atgcatggag ccaggtccgg tggaaccgtt gcaaccaccg atgacgttgg    960
tacagatcac gcagtaaata tcagtgttga tggctttgcc gggaccgagc aagtcagccc   1020
accaatcggc tgcgttggaa tctccagtga gggcgtgttc gatgagaacg acattgctgc   1080
gtccttcttt atctacgcgg tattcacccc agcggtgata ggcgatttca gcgtttgtaa   1140
tgattgctcc ggcttcggtg gagacatcac cgatcgcttg gatttcaagt tgacctgaag   1200
gcgcgagggt gggcattacg gggcgatcct ccttatgtat ggataattaa tgctttacaa   1260
gcttaggtta gggcacagta gccctacccg cccgtctaaa aagtgatcgt acaggtattc   1320
agtcgattac gttgcgacac ggcgggctgg ctgcccaaaa agcccccacg gcgatgaaat   1380
tttaaaagtc aaagttccat tgtcgtgggg gggatcctct agacccggga tttaaatcgc   1440
tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac   1500
cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa   1560
agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag   1620
```

caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag 1680
taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc 1740
aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 1800
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 1860
ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 1920
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 1980
cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 2040
tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 2100
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 2160
cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc 2220
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 2280
ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 2340
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 2400
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 2460
ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 2520
agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 2580
aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 2640
ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 2700
cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg 2760
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc 2820
tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 2880
cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag 2940
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc 3000
gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag 3060
gactataaag ataccaggcg tttcccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 3120
ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc 3180
atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg 3240
tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt 3300
ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 3360
gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 3420
ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag 3480
ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 3540
agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg 3600

ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa 3660
aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg 3720
tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg 3780
gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga atcatcagct atggatctct 3840
ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg 3900

gattttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg 3960
cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc 4020
ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg 4080
gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt 4140
gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg 4200
ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca 4260
cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc ggtgcccgca ggcatgacaa 4320
acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc 4380
acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg 4440
ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg 4500
tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa aaatgactct agcggattca 4560
cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc tgttcgacac ccatcccgag 4620
ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg 4680
ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac 4740
ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggt 4800
gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg 4860
tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt 4920
tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg 4980
ggaaatgcca gctcatctgg ctcattgatc cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc 5040
cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc 5100
aggctttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc 5160
gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcgca 5220
tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg 5280
cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag 5340
caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct 5400
ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg 5460
gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg 5520
agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg 5580
actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc 5640
cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca 5700
ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg gaaagaccca aacagtgagt 5760
acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta 5820
aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt tgagggagag actggctcgt 5880
ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag 5940
cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaatgt 6000
gccatctcgt aggcagaaaa cggttccccc gtagggtctc tctcttggcc tcctttctag 6060
gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc 6120
cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca aagatcttca aagccactgc 6180
cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac 6240

ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc 6300

ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgcgc 6360

ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6389

<210> 37

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1753

<400> 37

ggatctagag ttctgtgaaa aacaccgtg 29

<210> 38

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1754

<400> 38

gcgactagtg ccccacaaat aaaaaacac 29

<210> 39

<211> 5156

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> H247

<400> 39

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
cggacctagg gatatcgtcg acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatcct 120
ctagagttct gtgaaaaaca ccgtggggca gtttctgctt cgcggtgttt tttatttgtg 180
gggcactaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 240
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 300
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 360
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 420
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 480
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 540
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 600
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 660
ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 720
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 780
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 840
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 900
tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 960
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 1020
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 1080
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 1140
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 1200
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 1260
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 1320
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc 1380
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 1440
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 1500
tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 1560
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 1620
ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 1680
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1740
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1800
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccccctggaa 1860
gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 1920
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 1980
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 2040
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 2100
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 2160

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 2220
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 2280
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 2340
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 2400
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 2460
gccgcggccg cgcaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgt gccgcgtgat tttccgccaa 2520
aaactttaac gaacgttcgt tataatggtg tcatgacctt cacgacgaag tactaaaatt 2580
ggcccgaatc atcagctatg gatctctctg atgtcgcgct ggagtccgac gcgctcgatg 2640
ctgccgtcga tttaaaaacg gtgatcggat ttttccgagc tctcgatacg acggacgcgc 2700
cagcatcacg agactgggcc agtgccgcga gcgacctaga aactctcgtg gcggatcttg 2760
aggagctggc tgacgagctg cgtgctcggc cagcgccagg aggacgcaca gtagtggagg 2820
atgcaatcag ttgcgcctac tgcggtggcc tgattcctcc ccggcctgac ccgcgaggac 2880
ggcgcgcaaa atattgctca gatgcgtgtc gtgccgcagc cagccgcgag cgcgccaaca 2940
aacgccacgc cgaggagctg gaggcggcta ggtcgcaaat ggcgctggaa gtgcgtcccc 3000
cgagcgaaat tttggccatg gtcgtcacag agctggaagc ggcagcgaga attatcgcga 3060
tcgtggcggt gcccgcaggc atgacaaaca tcgtaaatgc cgcgtttcgt gtgccgtggc 3120

cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgtc 3180
gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatgttgaac 3240
gccccgtgag cggtaactca cagggcgtcg gctaaccccc agtccaaacc tgggagaaag 3300
cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc 3360
gctgatctgt tcgacaccca tcccgagctc gcgctgcgat cacgtggctg gacgagcgaa 3420
gaccgccgcg aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag caagacccgc 3480
gacttcgcca gcgcttggat caaagacccg gacacggaga aacacagccg aagttatacc 3540
gagttggttc aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgttgc tctgacgcac gcgcagcacg 3600
cagccgtgct tgtcctggac attgatgtgc cgagccacca ggccggcggg aaaatcgagc 3660
acgtaaaccc cgaggtctac gcgattttgg agcgctgggc acgcctggaa aaagcgccag 3720
cttggatcgg cgtgaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg 3780
tgtatgccgc agcaggcatg agcagcccga atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg 3840
aaatgacccg cgttttcggc gctgaccagg ctttttcaca taggctgagc cgtggccact 3900
gcactctccg acgatcccag ccgtaccgct ggcatgccca gcacaatcgc gtggatcgcc 3960
tagctgatct tatggaggtt gctcgcatga tctcaggcac agaaaaacct aaaaaacgct 4020
atgagcagga gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactgcgg 4080
aagcaaaagc acttgccacg cttgaagcaa gcctgccgag cgccgctgaa gcgtctggag 4140
agctgatcga cggcgtccgt gtcctctgga ctgctccagg gcgtgccgcc cgtgatgaga 4200
cggcttttcg ccacgctttg actgtgggat accagttaaa agcggctggt gagcgcctaa 4260
aagacaccaa gggtcatcga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgctcag gcggtcggag 4320
gaggccgtga gcctgatctg ccgccggact gtgaccgcca gacggattgg ccgcgacgtg 4380
tgcgcggcta cgtcgctaaa ggccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga 4440

gccagccgag gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgcag 4500
aacgctggaa agacccaaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaaa ctagctaagt 4560
ccagtcaacg acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca ggttggttta 4620
tgactgttga gggagagact ggctcgtggc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta 4680
gcgtgtcacg tcagaccgtg aatagagcac ttaaggtctg cgggcattga acttccacga 4740
ggacgccgaa agcttcccag taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg ttcccccgta 4800
gggtctctct cttggcctcc tttctaggtc gggctgattg ctcttgaagc tctctagggg 4860
ggctcacacc ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctcgtaagcg cacaaggact 4920
gctcccaaag atcttcaaag ccactgccgc gactgccttc gcgaagcctt gccccgcgga 4980
aatttcctcc accgagttcg tgcacacccc tatgccaagc ttctttcacc ctaaattcga 5040
gagattggat tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaatcg tcccctgatc gcccttgcga 5100
cgttggcgtc ggtgccgctg gttgcgcttg gcttgaccga cttgatcagc ggccgc 5156

<210> 40

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1848

<400> 40

gagaactagt agctgccaat tattccggg 29

<210> 41

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1849

<400> 41

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 42

<211> 6464

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pG A4 (H344)

<400> 42

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagta 60
gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc tacccgataa ataggtcggc tgaaaaattt 120
cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga 180
agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga 240
ttttttaccc atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga 300
tgtctccacc gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg 360
tgaataccgc gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt ctcatcgaac acgccctcac 420
tggagattcc aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa 480
cactgatatt tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg 540
acctggctcc atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat 600
tcgtgatcag gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc 660
cgcagtactt ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccg caatgtaccc 720
agaaactgtt ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat 780
cggcattcaa tccgcccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa 840
ctactacgaa tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgac gcatcgccca 900
cctcacctac cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa 960
cgaaaaccca ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt 1020
ggactaccaa gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc ggctcctacg tcttgctcac 1080
cgacgccctc aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga 1140
atccatcaaa gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca 1200
ccagcaagaa cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc 1260
ccctgtcggc cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa atggatcgca tcgtgaggaa 1320
cttcttcagc ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat 1380
ctaagtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agagttctgt 1440
gaaaaacacc gtggggcagt ttctgcttcg cggtgttttt tatttgtggg gcactagacc 1500
cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc 1560
agaaacggtg ctgaccccgg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg 1620

caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg 1680
cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaaggttg 1740
ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg 1800
gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat 1860
tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac 1920
agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc 1980
tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc 2040
tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag 2100
cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc 2160
ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg 2220
atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc 2280
ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc 2340
cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga 2400
cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca 2460

tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg 2520
atattgctga agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg 2580
ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgagcgg 2640
gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga 2700
ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg 2760
gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcc 2820
ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct 2880
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 2940
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 3000
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 3060
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 3120
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 3180
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 3240
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 3300
ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 3360
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 3420
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 3480
ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 3540
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 3600
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 3660
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 3720
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcg 3780
caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt tccgccaaaa actttaacga 3840
acgttcgtta taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat 3900

cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt 3960
taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag 4020
actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg 4080
acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt 4140
gcgcctactg cggtggcctg attcctcccc ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat 4200
attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg 4260
aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt 4320
tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc 4380
ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt 4440
gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac 4500
aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg 4560
gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg 4620
actctagcgg attcacgaga cattgacaca ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc 4680
gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa 4740
ttcctcgctc acctgggcag agaaaatttc cagggcagca agacccgcga cttcgccagc 4800
gcttggatca aagacccgga cacggagaaa cacagccgaa gttataccga gttggttcaa 4860
aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg 4920
tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg 4980
aggtctacgc gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg 5040
tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag 5100
caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc tggctgcaac gaccgaggaa atgacccgcg 5160
ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg tggccactgc actctccgac 5220
gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc acaatcgcgt ggatcgccta gctgatctta 5280
tggaggttgc tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt 5340
tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac 5400
ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg 5460
gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc 5520
acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg 5580
gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc 5640
ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg 5700
tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc 5760
gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag 5820
acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac 5880
aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg 5940
gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc 6000
agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag 6060
cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct 6120
tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctaggggggg ctcacaccat 6180

aggcagataa cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat 6240

cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac 6300

cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc 6360

ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg 6420

tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6464

<210> 43

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1695

<400> 43

gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 44

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf16

<400> 44

gagaactagt gtggctacga ctttcgcagc 30

<210> 45

<211> 6604

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pCliK5MCS PeftuPsod metA (H473)

<400> 45

tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga 60
aaatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct 120
gtgtgctcag tcttccaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga 180
aagtcgtagc cacactagta gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc tacccgataa 240
ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt 300
cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg 360
tgcggaaacc tacgaaagga ttttttaccc atgcccaccc tcgcgccttc aggtcaactt 420
gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc gaagccggag caatcattac aaacgctgaa 480
atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt 540
ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc 600
ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt 660
ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc atgcatccag atggaaattt ctggggtaat 720
cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca 780
ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta 840
gagtgggccg caatgtaccc agaaactgtt ggcgcagctg ctgttcttgc agtttctgca 900
cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa tccgcccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac 960
caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa tccggctgca acccagccac cggactcggc 1020
gccgcccgac gcatcgccca cctcacctac cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc 1080
ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc 1140
ttcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa gcagacaagc tagtacagcg tttcgacgcc 1200
ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga 1260
ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc 1320
gatattttgt acccctacca ccagcaagaa cacctctcca gaaacctggg aaatctactg 1380
gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc cacgatgctt tcctcaccga aagccgccaa 1440
atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg 1500
acctacatcg agttctacat ctaagtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt 1560
gggatcctct agagttctgt gaaaaacacc gtggggcagt ttctgcttcg cggtgttttt 1620
tatttgtggg gcactagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa 1680
cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccgg atgaatgtca gctactgggc 1740
tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac 1800
atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg 1860
ggcgccctct ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc 1920

aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg 1980
catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt 2040
cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc 2100
agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact 2160
gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt 2220
gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca 2280
ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat 2340
gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg 2400
catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga 2460
agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga 2520
cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa 2580
tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga 2640
catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt 2700
cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct 2760
tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac 2820
ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc 2880
gttttccggg acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc 2940
gcccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 3000
aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 3060
tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 3120
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 3180
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 3240
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 3300
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 3360
cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 3420
ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga 3480
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc 3540
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 3600
agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 3660
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca 3720
aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 3780
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 3840
ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 3900
aaaggccggc cgcggccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt 3960
tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta 4020
ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg agtccgacgc 4080
gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac 4140
ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc 4200
ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag gacgcacagt 4260

agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cggtggcctg attcctcccc ggcctgaccc 4320
gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg 4380
cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg cgctggaagt 4440
gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat 4500
tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt 4560
gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt 4620
cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa 4680
tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca gggcgtcggc taacccccag tccaaacctg 4740
ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca ccggcctgga 4800
aattttccgc tgatctgttc gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga 4860
cgagcgaaga ccgccgcgaa ttcctcgctc acctgggcag agaaaatttc cagggcagca 4920
agacccgcga cttcgccagc gcttggatca aagacccgga cacggagaaa cacagccgaa 4980
gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc tgacgcacgc 5040
gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa 5100
aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa 5160
agcgccagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat 5220
tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc tggctgcaac 5280
gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg 5340
tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc acaatcgcgt 5400
ggatcgccta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa 5460
aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc 5520
cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc 5580
gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc gtgccgcccg 5640
tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga 5700
gcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc 5760
ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga cggattggcc 5820
gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga 5880
gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa 5940
ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact 6000
agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg 6060
ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg aagctatgtc 6120
tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac 6180
ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt 6240
cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc 6300
tctaggggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct cgtaagcgca 6360
caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc 6420
cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt ctttcaccct 6480
aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc 6540

ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg 6600

ccgc 6604

<210> 46

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf64

<400> 46

gagaactagt ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 47

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf65

<400> 47

gcgcgagggt gggcattgta tgtcctcctg gacttc 36

<210> 48

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK1862)

<400> 48

atgcccaccc tcgcgcc 17

<210> 49

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK1849)

<400> 49

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 50

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK 1697

<400> 50

gagactcgag agctgccaat tattccggg 29

<210> 51

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf17)

<400> 51

gagaactagt taggtttccg caccgagc 28

<210> 52

<211> 6609

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pCLiK5MCS Psod Peft metA (H505)

<400> 52

tcgatttaaa tctcgagagc tgccaattat tccgggcttg tgacccgcta cccgataaat 60
aggtcggctg aaaaatttcg ttgcaatatc aacaaaaagg cctatcattg ggaggtgtcg 120
caccaagtac ttttgcgaag cgccatctga cggattttca aaagatgtat atgctcggtg 180
cggaaaccta actagtggcc gttaccctgc gaatgtccac agggtagctg gtagtttgaa 240
aatcaacgcc gttgccctta ggattcagta actggcacat tttgtaatgc gctagatctg 300
tgtgctcagt cttccaggct gcttatcaca gtgaaagcaa aaccaattcg tggctgcgaa 360
agtcgtagcc accacgaagt ccaggaggac atacaatgcc caccctcgcg ccttcaggtc 420
aacttgaaat ccaagcgatc ggtgatgtct ccaccgaagc cggagcaatc attacaaacg 480
ctgaaatcgc ctatcaccgc tggggtgaat accgcgtaga taaagaagga cgcagcaatg 540
tcgttctcat cgaacacgcc ctcactggag attccaacgc agccgattgg tgggctgact 600
tgctcggtcc cggcaaagcc atcaacactg atatttactg cgtgatctgt accaacgtca 660
tcggtggttg caacggttcc accggacctg gctccatgca tccagatgga aatttctggg 720
gtaatcgctt ccccgccacg tccattcgtg atcaggtaaa cgccgaaaaa caattcctcg 780
acgcactcgg catcaccacg gtcgccgcag tacttggtgg ttccatgggt ggtgcccgca 840
ccctagagtg ggccgcaatg tacccagaaa ctgttggcgc agctgctgtt cttgcagttt 900
ctgcacgcgc cagcgcctgg caaatcggca ttcaatccgc ccaaattaag gcgattgaaa 960
acgaccacca ctggcacgaa ggcaactact acgaatccgg ctgcaaccca gccaccggac 1020
tcggcgccgc ccgacgcatc gcccacctca cctaccgtgg cgaactagaa atcgacgaac 1080
gcttcggcac caaagcccaa aagaacgaaa acccactcgg tccctaccgc aagcccgacc 1140
agcgcttcgc cgtggaatcc tacttggact accaagcaga caagctagta cagcgtttcg 1200
acgccggctc ctacgtcttg ctcaccgacg ccctcaaccg ccacgacatt ggtcgcgacc 1260
gcggaggcct caacaaggca ctcgaatcca tcaaagttcc agtccttgtc gcaggcgtag 1320
ataccgatat tttgtacccc taccaccagc aagaacacct ctccagaaac ctgggaaatc 1380
tactggcaat ggcaaaaatc gtatcccctg tcggccacga tgctttcctc accgaaagcc 1440

gccaaatgga tcgcatcgtg aggaacttct tcagcctcat ctccccagac gaagacaacc 1500
cttcgaccta catcgagttc tacatctaag tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa 1560
caattgggat cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcggtg 1620
ttttttattt gtggggcact agacccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag 1680
cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac 1740
tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg 1800
cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca 1860
gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg 1920
ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg 1980
tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg 2040
ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg 2100
ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 2160
gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca 2220
gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 2280
gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat 2340
gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa 2400
catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg 2460
gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg 2520
cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg 2580
gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 2640
caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac 2700
cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc 2760
cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc 2820
ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg 2880
gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt 2940
tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta 3000
aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg 3060
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 3120
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 3180
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 3240
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 3300
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 3360
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 3420
ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 3480
cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 3540
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 3600
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 3660
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 3720

aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 3780
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 3840
gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 3900
cttttaaagg ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt 3960
gattttccgc caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg 4020
aagtactaaa attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc 4080
gacgcgctcg atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat 4140
acgacggacg cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc 4200
gtggcggatc ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc 4260
acagtagtgg aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct 4320
gacccgcgag gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc 4380
gagcgcgcca acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg 4440
gaagtgcgtc ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg 4500
agaattatcg cgatcgtggc ggtgcccgca ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt 4560
cgtgtgccgt ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc 4620
agcgtcgcgc gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg 4680
aaaaatgttg aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa 4740
acctgggaga aagcgctcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc 4800
ctggaaattt tccgctgatc tgttcgacac ccatcccgag ctcgcgctgc gatcacgtgg 4860
ctggacgagc gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg 4920
cagcaagacc cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag 4980
ccgaagttat accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggt gccagtatgt tgctctgacg 5040
cacgcgcagc acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc 5100
gggaaaatcg agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg 5160
gaaaaagcgc cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg 5220
ctcattgatc cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct 5280
gcaacgaccg aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggctttttc acataggctg 5340
agccgtggcc actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat 5400
cgcgtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa 5460
cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga 5520
aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct 5580
gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc 5640
gcccgtgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct 5700
ggtgagcgcc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct 5760
caggcggtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat 5820
tggccgcgac gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag 5880
acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt 5940
aaaaaggccg cagaacgctg gaaagaccca aacagtgagt acgcccgagc acagcgagaa 6000
aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt 6060

gcaggttggt ttatgactgt tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct 6120

atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat 6180

tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa 6240

cggttccccc gtagggtctc tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga 6300

agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa 6360

gcgcacaagg actgctccca aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc 6420

cttgccccgc ggaaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc 6480

accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg 6540

atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgcgc ttggcttgac cgacttgatc 6600

agcggccgc 6609

<210> 53

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK1701

<400> 53

gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

<210> 54

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf018

<400> 54

gagaactagt attttgtgtg tgccggttgt g 31

<210> 55

<211> 6583

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas ,

<223> designación interna: pCLiK5MCS PgroPsod metA (H472)

<400> 55

tcgatttaaa tctcgagcgg cttaaagttt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa 60
cagttgagtg ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg 120
ttcacccgcg acgacggctg tgctggaaac ccacaaccgg cacacacaaa atactagtag 180
ctgccaatta ttccgggctt gtgacccgct acccgataaa taggtcggct gaaaaatttc 240
gttgcaatat caacaaaaag gcctatcatt gggaggtgtc gcaccaagta cttttgcgaa 300
gcgccatctg acggattttc aaaagatgta tatgctcggt gcggaaacct acgaaaggat 360
tttttaccca tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat 420
gtctccaccg aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt 480
gaataccgcg tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact 540
ggagattcca acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac 600
actgatattt actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga 660
cctggctcca tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt 720
cgtgatcagg taaacgccga aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cacggtcgcc 780
gcagtacttg gtggttccat gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtaccca 840
gaaactgttg gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaatc 900
ggcattcaat ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac 960
tactacgaat ccggctgcaa cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgcccac 1020
ctcacctacc gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac 1080
gaaaacccac tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg 1140
gactaccaag cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt cttgctcacc 1200
gacgccctca accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa 1260
tccatcaaag ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac 1320
cagcaagaac acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc 1380
cctgtcggcc acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac 1440
ttcttcagcc tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc 1500
taagtcgaca tcgatgctct tctgcgttaa ttaacaattg ggatcctcta gagttctgtg 1560
aaaaacaccg tggggcagtt tctgcttcgc ggtgtttttt atttgtgggg cactagaccc 1620
gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca 1680
gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 1740

aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 1800
ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg 1860
gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 1920
atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 1980
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 2040
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 2100
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 2160
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 2220
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 2280
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 2340
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 2400
gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 2460
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 2520
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 2580
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga 2640
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 2700
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 2760
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat 2820
tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 2880
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg 2940
gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 3000
ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 3060
agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 3120
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 3180
tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 3240
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 3300
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 3360
cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 3420
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 3480
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 3540
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 3600
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 3660
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 3720
ttttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 3780
gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 3840
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcgc 3900
aaagtcccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt ccgccaaaaa ctttaacgaa 3960
cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac taaaattggc ccgaatcatc 4020

agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg ctcgatgctg ccgtcgattt 4080
aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg gacgcgccag catcacgaga 4140
ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg gatcttgagg agctggctga 4200
cgagctgcgt gctcggccag cgccaggagg acgcacagta gtggaggatg caatcagttg 4260
cgcctactgc ggtggcctga ttcctccccg gcctgacccg cgaggacggc gcgcaaaata 4320
ttgctcagat gcgtgtcgtg ccgcagccag ccgcgagcgc gccaacaaac gccacgccga 4380
ggagctggag gcggctaggt cgcaaatggc gctggaagtg cgtcccccga gcgaaatttt 4440
ggccatggtc gtcacagagc tggaagcggc agcgagaatt atcgcgatcg tggcggtgcc 4500
cgcaggcatg acaaacatcg taaatgccgc gtttcgtgtg ccgtggccgc ccaggacgtg 4560
tcagcgccgc caccacctgc accgaatcgg cagcagcgtc gcgcgtcgaa aaagcgcaca 4620
ggcggcaaga agcgataagc tgcacgaata cctgaaaaat gttgaacgcc ccgtgagcgg 4680
taactcacag ggcgtcggct aacccccagt ccaaacctgg gagaaagcgc tcaaaaatga 4740
ctctagcgga ttcacgagac attgacacac cggcctggaa attttccgct gatctgttcg 4800
acacccatcc cgagctcgcg ctgcgatcac gtggctggac gagcgaagac cgccgcgaat 4860
tcctcgctca cctgggcaga gaaaatttcc agggcagcaa gacccgcgac ttcgccagcg 4920
cttggatcaa agacccggac acggagaaac acagccgaag ttataccgag ttggttcaaa 4980
atcgcttgcc cggtgccagt atgttgctct gacgcacgcg cagcacgcag ccgtgcttgt 5040
cctggacatt gatgtgccga gccaccaggc cggcgggaaa atcgagcacg taaaccccga 5100
ggtctacgcg attttggagc gctgggcacg cctggaaaaa gcgccagctt ggatcggcgt 5160
gaatccactg agcgggaaat gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt atgccgcagc 5220
aggcatgagc agcccgaata tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa tgacccgcgt 5280
tttcggcgct gaccaggctt tttcacatag gctgagccgt ggccactgca ctctccgacg 5340
atcccagccg taccgctggc atgcccagca caatcgcgtg gatcgcctag ctgatcttat 5400
ggaggttgct cgcatgatct caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg agcaggagtt 5460
ttctagcgga cgggcacgta tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag caaaagcact 5520
tgccacgctt gaagcaagcc tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc tgatcgacgg 5580
cgtccgtgtc ctctggactg ctccagggcg tgccgcccgt gatgagacgg cttttcgcca 5640
cgctttgact gtgggatacc agttaaaagc ggctggtgag cgcctaaaag acaccaaggg 5700
tcatcgagcc tacgagcgtg cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag gccgtgagcc 5760
tgatctgccg ccggactgtg accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc gcggctacgt 5820
cgctaaaggc cagccagtcg tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc agccgaggcg 5880
aaaagctctg gccactatgg gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac gctggaaaga 5940
cccaaacagt gagtacgccc gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca gtcaacgaca 6000
agctaggaaa gctaaaggaa atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga ctgttgaggg 6060
agagactggc tcgtggccga caatcaatga agctatgtct gaatttagcg tgtcacgtca 6120
gaccgtgaat agagcactta aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga cgccgaaagc 6180
ttcccagtaa atgtgccatc tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg tctctctctt 6240
ggcctccttt ctaggtcggg ctgattgctc ttgaagctct ctaggggggc tcacaccata 6300
ggcagataac gttccccacc ggctcgcctc gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc 6360

ttcaaagcca ctgccgcgac tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat ttcctccacc 6420

gagttcgtgc acacccctat gccaagcttc tttcacccta aattcgagag attggattct 6480

taccgtggaa attcttcgca aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt tggcgtcggt 6540

gccgctggtt gcgcttggct tgaccgactt gatcagcggc cgc 6583

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: BK1782

<400> 56

tcgagagatt ggattcttac 20

<210> 57

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Haf63

<400> 57

tctcggtacc ccgcaccgag catatacatc 30

<210> 58

<211> 6450

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: H479 (pCliK5MCS PEF-TS metA)

<400> 58

aaatctcgag cttggtctat agtggctagg tacccccca cgacaatgga actttgactt 60
ttaaaatttc atcgccgtgg gggctttttg ggcagccagc ccgccgtgtc gcaacgtaat 120
cgactgaata cctgtacgat cacttttag acgggcgggt agggctactg tgccctaacc 180
taagcttgta aagcattaat tatccataca taaggaggat cgccccgtaa tgcccaccct 240
cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat gtctccaccg aagccggagc 300
aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt gaataccgcg tagataaaga 360
aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca acgcagccga 420
ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt actgcgtgat 480

ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca tgcatccaga 540
tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg taaacgccga 600
aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg gtggttccat 660
gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtaccca gaaactgttg gcgcagctgc 720
tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaatc ggcattcaat ccgcccaaat 780
taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat ccggctgcaa 840
cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg catcgcccac ctcacctacc gtggcgaact 900
agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac gaaaacccac tcggtcccta 960
ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg gactaccaag cagacaagct 1020
agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt cttgctcacc gacgccctca accgccacga 1080
cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa tccatcaaag ttccagtcct 1140
tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac cagcaagaac acctctccag 1200
aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc cctgtcggcc acgatgcttt 1260
cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac ttcttcagcc tcatctcccc 1320
agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc taagtcgaca tcgatgctct 1380
tctgcgttaa ttaacaattg ggatcctcta gagttctgtg aaaaacaccg tggggcagtt 1440
tctgcttcgc ggtgtttttt atttgtgggg cactagaccc gggatttaaa tcgctagcgg 1500
gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca gaaacggtgc tgaccccgga 1560
tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg 1620
tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg 1680
aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact 1740
ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagatct gatcaagaga 1800
caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg 1860
cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg 1920
ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt 1980
ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg 2040

gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc gggaagggac tggctgctat 2100
tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat 2160
ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg 2220
accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg 2280
atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc 2340
tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc 2400
cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg 2460
tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg 2520
gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca 2580
tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac 2640
cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga 2700
aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga 2760
tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg gccggcccgg tgtgaaatac 2820
cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 2880
actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa 2940
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 3000
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc 3060
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat 3120
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc 3180
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct 3240
cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 3300
aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc 3360
cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 3420
ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa 3480
ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta 3540
gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg ttttttttgtt tgcaagcagc 3600
agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg 3660
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 3720
tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcgc aaagtcccgc ttcgtgaaaa 3780
ttttcgtgcc gcgtgatttt ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca 3840
tgaccttcac gacgaagtac taaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg 3900
tcgcgctgga gtccgacgcg ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt 3960
tccgagctct cgatacgacg gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg 4020
acctagaaac tctcgtggcg gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggccag 4080
cgccaggagg acgcacagta gtggaggatg caatcagttg cgcctactgc ggtggcctga 4140
ttcctccccg gcctgacccg cgaggacggc gcgcaaaata ttgctcagat gcgtgtcgtg 4200
ccgcagccag ccgcgagcgc gccaacaaac gccacgccga ggagctggag gcggctaggt 4260
cgcaaatggc gctggaagtg cgtcccccga gcgaaatttt ggccatggtc gtcacagagc 4320

tggaagcggc agcgagaatt atcgcgatcg tggcggtgcc cgcaggcatg acaaacatcg 4380
taaatgccgc gtttcgtgtg ccgtggccgc ccaggacgtg tcagcgccgc caccacctgc 4440
accgaatcgg cagcagcgtc gcgcgtcgaa aaagcgcaca ggcggcaaga agcgataagc 4500
tgcacgaata cctgaaaaat gttgaacgcc ccgtgagcgg taactcacag ggcgtcggct 4560
aacccccagt ccaaacctgg gagaaagcgc tcaaaaatga ctctagcgga ttcacgagac 4620
attgacacac cggcctggaa attttccgct gatctgttcg acacccatcc cgagctcgcg 4680
ctgcgatcac gtggctggac gagcgaagac cgccgcgaat tcctcgctca cctgggcaga 4740
gaaaatttcc agggcagcaa gacccgcgac ttcgccagcg cttggatcaa agacccggac 4800
acggagaaac acagccgaag ttataccgag ttggttcaaa atcgcttgcc cggtgccagt 4860
atgttgctct gacgcacgcg cagcacgcag ccgtgcttgt cctggacatt gatgtgccga 4920
gccaccaggc cggcgggaaa atcgagcacg taaaccccga ggtctacgcg attttggagc 4980
gctgggcacg cctggaaaaa gcgccagctt ggatcggcgt gaatccactg agcgggaaat 5040
gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt atgccgcagc aggcatgagc agcccgaata 5100
tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa tgacccgcgt tttcggcgct gaccaggctt 5160
tttcacatag gctgagccgt ggccactgca ctctccgacg atcccagccg taccgctggc 5220
atgcccagca caatcgcgtg gatcgcctag ctgatcttat ggaggttgct cgcatgatct 5280
caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg agcaggagtt ttctagcgga cgggcacgta 5340
tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag caaaagcact tgccacgctt gaagcaagcc 5400
tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc tgatcgacgg cgtccgtgtc ctctggactg 5460
ctccagggcg tgccgcccgt gatgagacgg cttttcgcca cgctttgact gtgggatacc 5520
agttaaaagc ggctggtgag cgcctaaaag acaccaaggg tcatcgagcc tacgagcgtg 5580
cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag gccgtgagcc tgatctgccg ccggactgtg 5640
accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc gcggctacgt cgctaaaggc cagccagtcg 5700
tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc agccgaggcg aaaagctctg gccactatgg 5760
gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac gctggaaaga cccaaacagt gagtacgccc 5820
gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca gtcaacgaca agctaggaaa gctaaaggaa 5880
atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga ctgttgaggg agagactggc tcgtggccga 5940
caatcaatga agctatgtct gaatttagcg tgtcacgtca gaccgtgaat agagcactta 6000
aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga cgccgaaagc ttcccagtaa atgtgccatc 6060
tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg tctctctctt ggcctccttt ctaggtcggg 6120
ctgattgctc ttgaagctct ctaggggggc tcacaccata ggcagataac gttccccacc 6180
ggctcgcctc gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac 6240
tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat ttcctccacc gagttcgtgc acacccctat 6300
gccaagcttc tttcacccta aattcgagag attggattct taccgtggaa attcttcgca 6360
aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt tggcgtcggt gccgctggtt gcgcttggct 6420
tgaccgactt gatcagcggc cgctcgattt 6450

<210> 59

<211> 6759

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: H501 (pCliK5MCS Pgro Psod Pefts metA)

<400> 59

aaatctcgag cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga 60
gtgctggcac tctcgggggt agagtgccaa ataggttgtt tgacacacag ttgttcaccc 120
gcgacgacgg ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaatactag tagctgccaa 180
ttattccggg cttgtgaccc gctacccgat aaataggtcg gctgaaaaat ttcgttgcaa 240
tatcaacaaa aaggcctatc attgggaggt gtcgcaccaa gtacttttgc gaagcgccat 300
ctgacggatt ttcaaaagat gtatatgctc ggtgcggggt acccccccac gacaatggaa 360
ctttgacttt taaaatttca tcgccgtggg ggctttttgg gcagccagcc cgccgtgtcg 420
caacgtaatc gactgaatac ctgtacgatc actttttaga cgggcgggta gggctactgt 480
gccctaacct aagcttgtaa agcattaatt atccatacat aaggaggatc gccccgtaat 540
gcccaccctc gcgccttcag gtcaacttga aatccaagcg atcggtgatg tctccaccga 600
agccggagca atcattacaa acgctgaaat cgcctatcac cgctggggtg aataccgcgt 660
agataaagaa ggacgcagca atgtcgttct catcgaacac gccctcactg gagattccaa 720
cgcagccgat tggtgggctg acttgctcgg tcccggcaaa gccatcaaca ctgatattta 780
ctgcgtgatc tgtaccaacg tcatcggtgg ttgcaacggt tccaccggac ctggctccat 840
gcatccagat ggaaatttct ggggtaatcg cttccccgcc acgtccattc gtgatcaggt 900
aaacgccgaa aaacaattcc tcgacgcact cggcatcacc acggtcgccg cagtacttgg 960
tggttccatg ggtggtgccc gcaccctaga gtgggccgca atgtacccag aaactgttgg 1020
cgcagctgct gttcttgcag tttctgcacg cgccagcgcc tggcaaatcg gcattcaatc 1080
cgcccaaatt aaggcgattg aaaacgacca ccactggcac gaaggcaact actacgaatc 1140
cggctgcaac ccagccaccg gactcggcgc cgcccgacgc atcgcccacc tcacctaccg 1200
tggcgaacta gaaatcgacg aacgcttcgg caccaaagcc caaaagaacg aaaacccact 1260
cggtccctac cgcaagcccg accagcgctt cgccgtggaa tcctacttgg actaccaagc 1320
agacaagcta gtacagcgtt tcgacgccgg ctcctacgtc ttgctcaccg acgccctcaa 1380
ccgccacgac attggtcgcg accgcggagg cctcaacaag gcactcgaat ccatcaaagt 1440
tccagtcctt gtcgcaggcg tagataccga tattttgtac ccctaccacc agcaagaaca 1500
cctctccaga aacctgggaa atctactggc aatggcaaaa atcgtatccc ctgtcggcca 1560
cgatgctttc ctcaccgaaa gccgccaaat ggatcgcatc gtgaggaact tcttcagcct 1620
catctcccca gacgaagaca acccttcgac ctacatcgag ttctacatct aagtcgacat 1680
cgatgctctt ctgcgttaat taacaattgg gatcctctag agttctgtga aaaacaccgt 1740

ggggcagttt ctgcttcgcg gtgtttttta tttgtggggc actagacccg ggatttaaat 1800
cgctagcggg ctgctaaagg aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct 1860
gaccccggat gaatgtcagc tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga 1920
gaaagcaggt agcttgcagt gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga 1980
cagcaagcga accggaattg ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca 2040
aagtaaactg gatggctttc ttgccgccaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg 2100
atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt 2160
ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct 2220
gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga 2280
ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg 2340
ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact 2400
ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg 2460
agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct 2520
gcccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg 2580
gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt 2640
tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg 2700
cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc 2760
ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag 2820
agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt 2880
cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt 2940
cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc 3000
cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca 3060
gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgccgg ccggcccggt 3120
gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttcct 3180
cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 3240
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 3300
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc 3360
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 3420
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 3480
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 3540
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 3600
gtgtgcacga acccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 3660
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 3720
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 3780
acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 3840
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt 3900
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 3960
cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 4020

caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggccggccg cggccgcgca aagtcccgct 4080
tcgtgaaaat tttcgtgccg cgtgattttc cgccaaaaac tttaacgaac gttcgttata 4140
atggtgtcat gaccttcacg acgaagtact aaaattggcc cgaatcatca gctatggatc 4200
tctctgatgt cgcgctggag tccgacgcgc tcgatgctgc cgtcgattta aaaacggtga 4260
tcggattttt ccgagctctc gatacgacgg acgcgccagc atcacgagac tgggccagtg 4320
ccgcgagcga cctagaaact ctcgtggcgg atcttgagga gctggctgac gagctgcgtg 4380
ctcggccagc gccaggagga cgcacagtag tggaggatgc aatcagttgc gcctactgcg 4440
gtggcctgat tcctccccgg cctgacccgc gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagatg 4500
cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg 4560
cggctaggtc gcaaatggcg ctggaagtgc gtcccccgag cgaaattttg gccatggtcg 4620
tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta tcgcgatcgt ggcggtgccc gcaggcatga 4680
caaacatcgt aaatgccgcg tttcgtgtgc cgtggccgcc caggacgtgt cagcgccgcc 4740
accacctgca ccgaatcggc agcagcgtcg cgcgtcgaaa aagcgcacag gcggcaagaa 4800
gcgataagct gcacgaatac ctgaaaaatg ttgaacgccc cgtgagcggt aactcacagg 4860
gcgtcggcta acccccagtc caaacctggg agaaagcgct caaaaatgac tctagcggat 4920
tcacgagaca ttgacacacc ggcctggaaa ttttccgctg atctgttcga cacccatccc 4980
gagctcgcgc tgcgatcacg tggctggacg agcgaagacc gccgcgaatt cctcgctcac 5040
ctgggcagag aaaatttcca gggcagcaag acccgcgact tcgccagcgc ttggatcaaa 5100
gacccggaca cggagaaaca cagccgaagt tataccgagt tggttcaaaa tcgcttgccc 5160
ggtgccagta tgttgctctg acgcacgcgc agcacgcagc cgtgcttgtc ctggacattg 5220
atgtgccgag ccaccaggcc ggcgggaaaa tcgagcacgt aaaccccgag gtctacgcga 5280
ttttggagcg ctgggcacgc ctggaaaaag cgccagcttg gatcggcgtg aatccactga 5340
gcgggaaatg ccagctcatc tggctcattg atccggtgta tgccgcagca ggcatgagca 5400
gcccgaatat gcgcctgctg gctgcaacga ccgaggaaat gacccgcgtt ttcggcgctg 5460
accaggcttt ttcacatagg ctgagccgtg gccactgcac tctccgacga tcccagccgt 5520
accgctggca tgcccagcac aatcgcgtgg atcgcctagc tgatcttatg gaggttgctc 5580
gcatgatctc aggcacagaa aaacctaaaa aacgctatga gcaggagttt tctagcggac 5640
gggcacgtat cgaagcggca agaaaagcca ctgcggaagc aaaagcactt gccacgcttg 5700
aagcaagcct gccgagcgcc gctgaagcgt ctggagagct gatcgacggc gtccgtgtcc 5760
tctggactgc tccagggcgt gccgcccgtg atgagacggc ttttcgccac gctttgactg 5820
tgggatacca gttaaaagcg gctggtgagc gcctaaaaga caccaagggt catcgagcct 5880
acgagcgtgc ctacaccgtc gctcaggcgg tcggaggagg ccgtgagcct gatctgccgc 5940
cggactgtga ccgccagacg gattggccgc gacgtgtgcg cggctacgtc gctaaaggcc 6000
agccagtcgt ccctgctcgt cagacagaga cgcagagcca gccgaggcga aaagctctgg 6060
ccactatggg aagacgtggc ggtaaaaagg ccgcagaacg ctggaaagac ccaaacagtg 6120
agtacgcccg agcacagcga gaaaaactag ctaagtccag tcaacgacaa gctaggaaag 6180
ctaaaggaaa tcgcttgacc attgcaggtt ggtttatgac tgttgaggga gagactggct 6240
cgtggccgac aatcaatgaa gctatgtctg aatttagcgt gtcacgtcag accgtgaata 6300
gagcacttaa ggtctgcggg cattgaactt ccacgaggac gccgaaagct tcccagtaaa 6360

tgtgccatct cgtaggcaga aaacggttcc cccgtagggt ctctctcttg gcctcctttc 6420

taggtcgggc tgattgctct tgaagctctc tagggggggct cacaccatag gcagataacg 6480

ttccccaccg gctcgcctcg taagcgcaca aggactgctc ccaaagatct tcaaagccac 6540

tgccgcgact gccttcgcga agccttgccc cgcggaaatt tcctccaccg agttcgtgca 6600

caccctatg ccaagcttct ttcaccctaa attcgagaga ttggattctt accgtggaaa 6660

ttcttcgcaa aaatcgtccc ctgatcgccc ttgcgacgtt ggcgtcggtg ccgctggttg 6720

cgcttggctt gaccgacttg atcagcggcc gctcgattt 6759

<210> 60

<211> 6780

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: H502 (pCliK5MCS Peftu Psod Pefts metA)

<400> 60

aaatctcgag ggccgttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa 60
cgccgttgcc cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct 120
cagtcttcca ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt 180
agccacacta gtagctgcca attattccgg gcttgtgacc cgctacccga taaataggtc 240
ggctgaaaaa tttcgttgca atatcaacaa aaaggcctat cattgggagg tgtcgcacca 300
agtacttttg cgaagcgcca tctgacggat tttcaaaaga tgtatatgct cggtgcgggg 360
tacccccccа cgacaatgga actttgactt ttaaaatttc atcgccgtgg gggctttttg 420
ggcagccagc ccgccgtgtc gcaacgtaat cgactgaata cctgtacgat cacttttttag 480
acgggcgggt agggctactg tgccctaacc taagcttgta aagcattaat tatccataca 540
taaggaggat cgccccgtaa tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc 600
gatcggtgat gtctccaccg aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca 660
ccgctggggt gaataccgcg tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca 720
cgccctcact ggagattcca acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa 780
agccatcaac actgatattt actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg 840
ttccaccgga cctggctcca tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc 900
cacgtccatt cgtgatcagg taaacgccga aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac 960
cacggtcgcc gcagtacttg gtggttccat gggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc 1020
aatgtaccca gaaactgttg gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc 1080
ctggcaaatc ggcattcaat ccgcccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca 1140

cgaaggcaac tactacgaat ccggctgcaa cccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg 1200
catcgcccac ctcacctacc gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc 1260
ccaaaagaac gaaaacccac tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga 1320
atcctacttg gactaccaag cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gctcctacgt 1380
cttgctcacc gacgccctca accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa 1440
ggcactcgaa tccatcaaag ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta 1500
cccctaccac cagcaagaac acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa 1560
aatcgtatcc cctgtcggcc acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcat 1620
cgtgaggaac ttcttcagcc tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga 1680
gttctacatc taagtcgaca tcgatgctct tctgcgttaa ttaacaattg ggatcctcta 1740
gagttctgtg aaaaacaccg tggggcagtt tctgcttcgc ggtgtttttt atttgtgggg 1800
cactagaccc gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag 1860
ccagtccgca gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa 1920
gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc 1980
tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg 2040
gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat 2100
ggcgcagggg atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac 2160
aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact 2220
gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc 2280
gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg 2340
cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg 2400
tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt 2460
catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc 2520
atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag 2580
cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg 2640
ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc 2700
tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt 2760
ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg 2820
ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt 2880
acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct 2940
tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg 3000
agatttcgat tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga 3060
cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag 3120
cggcgcgccg gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 3180
tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 3240
gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 3300
caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 3360
tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 3420
gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 3480

ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 3540
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 3600
tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 3660
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag 3720
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 3780
agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga 3840
agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg 3900
gtagcggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 3960
aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 4020
ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc 4080
gcggccgcgc aaagtcccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt ccgccaaaaa 4140
ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca tgaccttcac gacgaagtac taaaattggc 4200
ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg ctcgatgctg 4260
ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt tccgagctct cgatacgacg gacgcgccag 4320
catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg gatcttgagg 4380
agctggctga cgagctgcgt gctcggccag cgccaggagg acgcacagta gtggaggatg 4440
caatcagttg cgcctactgc ggtggcctga ttcctccccg gcctgacccg cgaggacggc 4500
gcgcaaaata ttgctcagat gcgtgtcgtg ccgcagccag ccgcgagcgc gccaacaaac 4560
gccacgccga ggagctggag gcggctaggt cgcaaatggc gctggaagtg cgtcccccga 4620
gcgaaatttt ggccatggtc gtcacagagc tggaagcggc agcgagaatt atcgcgatcg 4680
tggcggtgcc cgcaggcatg acaaacatcg taaatgccgc gtttcgtgtg ccgtggccgc 4740
ccaggacgtg tcagcgccgc caccacctgc accgaatcgg cagcagcgtc gcgcgtcgaa 4800
aaagcgcaca ggcggcaaga agcgataagc tgcacgaata cctgaaaaat gttgaacgcc 4860
ccgtgagcgg taactcacag ggcgtcggct aacccccagt ccaaacctgg gagaaagcgc 4920
tcaaaaatga ctctagcgga ttcacgagac attgacacac cggcctggaa attttccgct 4980
gatctgttcg acacccatcc cgagctcgcg ctgcgatcac gtggctggac gagcgaagac 5040
cgccgcgaat tcctcgctca cctgggcaga gaaaatttcc agggcagcaa gacccgcgac 5100
ttcgccagcg cttggatcaa agacccggac acggagaaac acagccgaag ttataccgag 5160
ttggttcaaa atcgcttgcc cggtgccagt atgttgctct gacgcacgcg cagcacgcag 5220
ccgtgcttgt cctggacatt gatgtgccga gccaccaggc cggcgggaaa atcgagcacg 5280
taaaccccga ggtctacgcg attttggagc gctgggcacg cctggaaaaa gcgccagctt 5340
ggatcggcgt gaatccactg agcgggaaat gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt 5400
atgccgcagc aggcatgagc agcccgaata tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa 5460
tgacccgcgt tttcggcgct gaccaggctt tttcacatag gctgagccgt ggccactgca 5520
ctctccgacg atcccagccg taccgctggc atgcccagca caatcgcgtg gatcgcctag 5580
ctgatcttat ggaggttgct cgcatgatct caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg 5640
agcaggagtt ttctagcgga cgggcacgta tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag 5700
caaaagcact tgccacgctt gaagcaagcc tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc 5760

tgatcgacgg cgtccgtgtc ctctggactg ctccagggcg tgccgcccgt gatgagacgg 5820
cttttcgcca cgctttgact gtgggatacc agttaaaagc ggctggtgag cgcctaaaag 5880
acaccaaggg tcatcgagcc tacgagcgtg cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag 5940
gccgtgagcc tgatctgccg ccggactgtg accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc 6000
gcggctacgt cgctaaaggc cagccagtcg tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc 6060
agccgaggcg aaaagctctg gccactatgg gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac 6120
gctggaaaga cccaaacagt gagtacgccc gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca 6180
gtcaacgaca agctaggaaa gctaaaggaa atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga 6240
ctgttgaggg agagactggc tcgtggccga caatcaatga agctatgtct gaatttagcg 6300
tgtcacgtca gaccgtgaat agagcactta aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga 6360
cgccgaaagc ttcccagtaa atgtgccatc tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg 6420
tctctctctt ggcctccttt ctaggtcggg ctgattgctc ttgaagctct ctaggggggc 6480
tcacaccata ggcagataac gttccccacc ggctcgcctc gtaagcgcac aaggactgct 6540
cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat 6600
ttcctccacc gagttcgtgc acacccctat gccaagcttc tttcacccta aattcgagag 6660
attggattct taccgtggaa attcttcgca aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt 6720
tggcgtcggt gccgctggtt gcgcttggct tgaccgactt gatcagcggc cgctcgattt 6780

<210> 61

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 61

gagagagaga cgcgtcccag tggctgagac gcatc 35

<210> 62

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 62

ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg 34

<210> 63

<211> 4323

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pCLiK5 MCS integrante SacB (también denominado pcIS)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (457)..(1248)

<223> KanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3840)..(4302)

<223> PsacB (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (2418)..(3839)

<223> SacB (complementario)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1515)..(2375)

<223> Ori-Ec (pMB) (complementario)

<400> 63

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120
tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600

gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg 1440
gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttcccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 1980
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgttagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaa gcatgtaaat atcgttagac gtaatgccgt caatcgtcat ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca ctttttttcag tgtgtaatca 2880

tcgtttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240
gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatgcaa agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgcga cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660
ttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcatc 3840
gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcggtctgc ttcttccagc cctcctgttt 3900
gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080
attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200
gcataaagtt gccttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
taatagtgaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320
atc 4323

<210> 64

<211> 5860

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (155)..(1420)

<223> lysC

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3935)..(5356)

<223> sacB (Bacillus subtilis)

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (5357)..(5819)

<223> Promotor sacB complemento

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1974)..(2765)

<223> kanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3032)..(3892)

<223> Ori-EC complemento

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3913)..(3934)

<223> sacB región corriente abajo (complemento)

<400> 64

cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggctc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840

acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaaggtt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500
cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc 2820
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccccctggaa 3300
gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600
tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggt ttcatcactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcatc gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc 4920
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg cattttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggccttttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
acttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460

tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgcctg 5520

ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580

tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640

gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700

tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760

tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820

gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 65

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 65

cggcaccacc gacatcatct tcacctgccc tcgttccg 38

<210> 66

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 66

cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tggtgccg 38

<210> 67

<211> 1263

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> lysc gen

<400> 67

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggt tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt 360
gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca gggtgttaat 420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cggtgtgtat 540
accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgct 660
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
cgc 1263

<210> 68

<211> 5860

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pCIS sysc thr311ile

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (155)..(1420)

<223> lysC

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3935)..(5356)

<223> sacB (Bacillus subtilis) complemento

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (5357).'.(5819)

<223> Promotor sacB complement

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (1974)..(2765)

<223> kanR

<220>

<221> características_misceláneas

<222> (3032)..(3892)

<223> ori-EC complemento

<400> 68

```
cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc     60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt    120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg    180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac    240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga    300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct    360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg    420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg    480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa    540
gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt    600
gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt    660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa    720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggctc    780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt    840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc    900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt    960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaaggtt ttccgtgcgt tggctgatgc   1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga   1080
catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct   1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct   1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg   1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat   1320
```

ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500
cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc 2820
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 3300
gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600

tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggt ttcatcactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcatc gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc 4920
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg cattttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
acttttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgcctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 69

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Old38

<400> 69

acatccatgg tggccgttac cctgcgaat 29

<210> 70

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Old 39

<400> 70

tgtatgtcct cctggacttc 20

<210> 71

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: old40

<400> 71

gaagtccagg aggacataca atgaccaaca tccgcgtagc 40

<210> 72

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: old 37

<400> 72

gaaaccacac tgtttccttg c 21

<210> 73

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: old 32

<400> 73

atcaacgcgt cgacaccaca tcatcaatca c 31

<210> 74

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: old33

<400> 74

atcaccatgg gttcttgtaa tcctccaaaa ttg 33

<210> 75

<211> 6187

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pCIS Peftu ddh (pCLiK int sacB Peftu ddh)

<400> 75

tcgagctaaa ttagacgtcg cgtgcgatca gatcgtccaa gttctctggg gagagcaggt 60
atggagcaac ttcgaggacg gtgaaagctc cgctttggcc ctgctgcttc atgcggtgag 120
ctgcgcgacc gaaagcgatc tgtgaggaag cggtgaaatc tgggtttcgg tccagcttga 180
ggatgtattc cacggtgtgg ttgaagccac cggtgtcgcc ggtggtaatc acgtggccac 240
cgtgtggcat gccggtgtgc tcggagtcga aggttgcttc gtcgatgaag ttgacttcga 300
cttcgtagcc aacgaagtaa tcaggcatgg tgcggatgtc gttttcgatg cgctcgtgat 360
cggccgcgtc ggcaaccacg aagcattggc gcttgtgggt ttgctttccg gtaaggtcgc 420
cggcttcgcc gcggcgggcc ttttccaggg cgtcttcgga tgggagggtg tactggactg 480
ccttttgaac gccagggatg cgtcgcaaag catcggagtg gccctgtgac aaacctgggc 540
cccagaaggt gtgctgctgg tgctcggcta agactgccgc tgcgtagacg cggttgatgg 600
agaacattcc tggatcccag ccggtagaga ccagtgcaac gttgccggct gcggtggcgg 660
cttcgttcat gacctggcgg tggcgtggga tgtcgcggtg gttgtcgtag gtgtctacgg 720
tgcaggcgaa ctgcgcgaac tttggtgcct gctcagggat gtcggtggcg gagcccatgc 780
acaggaacag cacgtccacg tcgtcggcgt gcttgtccac gtcggcgaca tcaaagactg 840
gcgtctttgt gtcgagggtg gcccggcgcg agaagattcc tacaaggtcc atgtcgggct 900
gcttggcaat aagcttttcg acgctgcgtc ccaggtttcc gtagcccacg atagctacgc 960
ggatgttggt cattgtatgt cctcctggac ttcgtggtgg ctacgacttt cgcagccacg 1020
aattggtttt gctttcactg tgataagcag cctggaagac tgagcacaca gatctagcgc 1080
attacaaaat gtgccagtta ctgaatccta agggcaacgg cgttgatttt caaactacca 1140
gctaccctgt ggacattcgc agggtaacgg ccaccatggg ttcttgtaat cctccaaaat 1200
tgtggtggca ctgtcctggt cgagcttacc gagatgcata cttagatgat gattcaggga 1260
catctctttc atcaggaccg aaagcgaacg tttcgtattg ttgagccttt tggttccacc 1320
acggatgcgc tgatctattt tcatggctcc cagcagtcag gatctgtggg gcgcagcttc 1380
accaacagga cttttgatcc gttgccgttc atggtggttt atccggatgg ggtggatcag 1440
cattggaatg atgcgcggtt gggtttggat gaaaataccc gccatttagg cattgatgat 1500
gtggggttct ttgtaaaact cgccacgcac ttgggcaaca cgtatggcat caagaggatc 1560

tttattgttg gctattccaa cggtgggcag atggtgttgc ggctcatgca tgaggttccc 1620
aagatgctca gtggcgctgc aaccattgca tccaacatgc cagttgcaga gaatacgctg 1680
ccgcaggtga aaaccttcaa gacacatccg gtgccttatt tggcgatggc tggaactgcc 1740
gatacttttt caccgtatga gggtggcgat gccggtattg gtcgcgaaca ccgccgtggc 1800
gtgggcatgt ccgcctttga ttcagctgcc tatattgccg cccgaaacgg actgaccgaa 1860
caccgccacg acgtgattga tgatgtggtg tcgacgcgtc atatgactag ttcggaccta 1920
gggatatcgt cgacatcgat gctcttctgc gttaattaac aattgggatc ctctagaccc 1980
gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca 2040
gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 2100
aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 2160
ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg 2220
gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 2280
atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 2340
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 2400
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 2460
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 2520
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 2580
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 2640
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 2700
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 2760
gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 2820
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 2880
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 2940
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga 3000
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 3060
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 3120
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat 3180
tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 3240
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg 3300
gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 3360
ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 3420
agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 3480
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 3540
tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 3600
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 3660
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 3720
cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 3780
caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 3840
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 3900

taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 3960
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 4020
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 4080
ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 4140
gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 4200
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcca 4260
tcggcatttt cttttgcgtt tttatttgtt aactgttaat tgtccttgtt caaggatgct 4320
gtctttgaca acagatgttt tcttgccttt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaacgt 4380
tgattgtttg tctgcgtaga atcctctgtt tgtcatatag cttgtaatca cgacattgtt 4440
tcctttcgct tgaggtacag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag 4500
atccattttt aacacaaggc agttttgtt cagcggcttg tatgggccag ttaaagaatt 4560
agaaacataa ccaagcatgt aaatatcgtt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga 4620
tccgcgggag tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcgcgttc 4680
aatttcatct gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta 4740
atcatcgttt agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt 4800
atcgctttgc agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta 4860
tgctttgtta aataaagatt cttcgccttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc 4920
aaatactaag tatttgtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatggtt 4980
gtcgcctgag ctgtagttgc cttcatcgat gaactgctgt acattttgat acgtttttcc 5040
gtcaccgtca aagattgatt tataatcctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga 5100
tgctgatacg ttaacttgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatgtt taccggagaa 5160
atcagtgtag aataaacgga tttttccgtc agatgtaaat gtggctgaac ctgaccattc 5220
ttgtgtttgg tcttttagga tagaatcatt tgcatcgaat ttgtcgctgt ctttaaagac 5280
gcggccagcg tttttccagc tgtcaataga agtttcgccg acttttttgat agaacatgta 5340
aatcgatgtg tcatccgcat ttttaggatc tccggctaat gcaaagacga tgtggtagcc 5400
gtgatagttt gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag 5460
gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa cttgatattt 5520
ttcatttttt tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc 5580
gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc 5640
tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatgtt 5700
catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggt ctgcttcttc cagccctcct 5760
gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg 5820
acgccaaagt atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt tatcagtaac 5880
aaacccgcgc gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg attgcaactg 5940
gtctattttc ctcttttgtt tgatagaaaa tcataaaagg atttgcagac tacgggccta 6000
aagaactaaa aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag tttctgttgc 6060
atgggcataa agttgccttt ttaatcacaa ttcagaaaat atcataatat ctcatttcac 6120
taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat 6180

ttaaatc 6187

<210> 76

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: CK461

<400> 76

cctgacgtcg caatataggc agctgaatc 29

<210> 77

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: CK466

<400> 77

gcccaattgg ttcttgtaat cctccaaaa 29

<210> 78

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: CK426

<400> 78

cgccaattgt cgagggccgt taccct 26

<210> 79

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: Eck463

<400> 79

gctacgcgga tgttggtcat gggtaaaaaa tcctttcgta 40

<210> 80

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: CK464

<400> 80

tacgaaagga ttttttaccc atgaccaaca tccgcgtagc 40

<210> 81

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: CK467

<400> 81

agacccgggt tagacgtcgc gtgcgatca 29

<210> 82

<211> 6233

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Plásmido

<220>

<221> características_misceláneas

<223> designación interna: pCIS PeftuPsod ddh = pclik int sacB PeftuPs od ddh

<400> 82

gggatttaaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca 60
gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 120
aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 180
ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttgg 240
gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 300
atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 360
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 420
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 480
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 540
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 600
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 660
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 720
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 780
gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 840
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 900
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 960
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga 1020

tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 1080
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 1140
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg agatttcgat 1200
tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg 1260
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgccg 1320
gccggcccgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 1380
ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 1440

agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 1500
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 1560
tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 1620
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 1680
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 1740
cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 1800
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 1860
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 1920
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc 1980
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 2040
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 2100
ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 2160
gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 2220
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcca 2280
tcggcatttt cttttgcgtt tttatttgtt aactgttaat tgtccttgtt caaggatgct 2340
gtctttgaca acagatgttt tcttgccttt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaacgt 2400
tgattgtttg tctgcgtaga atcctctgtt tgtcatatag cttgtaatca cgacattgtt 2460
tcctttcgct tgaggtacag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag 2520
atccattttt aacacaaggc cagttttgtt cagcggcttg tatgggccag ttaaagaatt 2580
agaaacataa ccaagcatgt aaatatcgtt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga 2640
tccgcgggag tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcgcgttc 2700
aatttcatct gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta 2760
atcatcgttt agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt 2820
atcgctttgc agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta 2880
tgctttgtta aataaagatt cttcgccttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc 2940
aaatactaag tatttgtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatggtt 3000
gtcgcctgag ctgtagttgc cttcatcgat gaactgctgt acattttgat acgtttttcc 3060
gtcaccgtca aagattgatt tataatcctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga 3120
tgctgatacg ttaacttgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatgtt taccggagaa 3180
atcagtgtag aataaacgga tttttccgtc agatgtaaat gtggctgaac ctgaccattc 3240
ttgtgtttgg tcttttagga tagaatcatt tgcatcgaat ttgtcgctgt ctttaaagac 3300
gcggccagcg tttttccagc tgtcaataga agtttcgccg acttttttgat agaacatgta 3360
aatcgatgtg tcatccgcat ttttaggatc tccggctaat gcaaagacga tgtggtagcc 3420
gtgatagttt gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag 3480
gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa cttgatattt 3540
ttcatttttt tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc 3600
gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc 3660
tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatgtt 3720

catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggt ctgcttcttc cagccctcct 3780
gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg 3840
acgccaaagt atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt tatcagtaac 3900
aaacccgcgc gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg attgcaactg 3960
gtctattttc ctcttttgtt tgatagaaaa tcataaaagg atttgcagac tacgggccta 4020
aagaactaaa aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag tttctgttgc 4080
atgggcataa agttgccttt ttaatcacaa ttcagaaaat atcataatat ctcatttcac 4140
taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat 4200
ttaaatctcg agaggcctga cgtcgcaata taggcagctg aatcaaaggc ggacatgccc 4260
acgccacggc ggtgttcgcg accaataccg gcatcgccac cctcatacgg tgaaaaagta 4320
tcggcagttc cagccatcgc caaataaggc accggatgtg tcttgaaggt tttcacctgc 4380
ggcagcgtat tctctgcaac tggcatgttg gatgcaatgg ttgcagcgcc actgagcatc 4440
ttgggaacct catgcatgag ccgcaacacc atctgcccac cgttggaata gccaacaata 4500
aagatcctct tgatgccata cgtgttgccc aagtgcgtgg cgagttttac aaagaacccc 4560
acatcatcaa tgcctaaatg gcgggtattt tcatccaaac ccaaccgcgc atcattccaa 4620
tgctgatcca ccccatccgg ataaaccacc atgaacggca acggatcaaa agtcctgttg 4680
gtgaagctgc gccccacaga tcctgactgc tgggagccat gaaaatagat cagcgcatcc 4740
gtggtggaac caaaaggctc aacaatacga aacgttcgct ttcggtcctg atgaaagaga 4800
tgtccctgaa tcatcatcta agtatgcatc tcggtaagct cgaccaggac agtgccacca 4860

caattttgga ggattacaag aaccaattgt cgagggccgt taccctgcga atgtccacag 4920
ggtagctggt agtttgaaaa tcaacgccgt tgcccttagg attcagtaac tggcacattt 4980
tgtaatgcgc tagatctgtg tgctcagtct tccaggctgc ttatcacagt gaaagcaaaa 5040
ccaattcgtg gctgcgaaag tcgtagccac actagtagct gccaattatt ccgggcttgt 5100
gacccgctac ccgataaata ggtcggctga aaaatttcgt tgcaatatca acaaaaaggc 5160
ctatcattgg gaggtgtcgc accaagtact tttgcgaagc gccatctgac ggattttcaa 5220
aagatgtata tgctcggtgc ggaaacctac gaaaggattt tttacccatg accaacatcc 5280
gcgtagctat cgtgggctac ggaaacctgg gacgcagcgt cgaaaagctt attgccaagc 5340
agcccgacat ggaccttgta ggaatcttct cgcgccgggc caccctcgac acaaagacgc 5400
cagtctttga tgtcgccgac gtggacaagc acgccgacga cgtggacgtg ctgttcctgt 5460
gcatgggctc cgccaccgac atccctgagc aggcaccaaa gttcgcgcag ttcgcctgca 5520
ccgtagacac ctacgacaac caccgcgaca tcccacgcca ccgccaggtc atgaacgaag 5580
ccgccaccgc agccggcaac gttgcactgg tctctaccgg ctgggatcca ggaatgttct 5640
ccatcaaccg cgtctacgca gcggcagtct tagccgagca ccagcagcac accttctggg 5700
gcccaggttt gtcacagggc cactccgatg ctttgcgacg catccctggc gttcaaaagg 5760
cagtccagta caccctccca tccgaagacg ccctggaaaa ggcccgccgc ggcgaagccg 5820
gcgaccttac cggaaagcaa acccacaagc gccaatgctt cgtggttgcc gacgcggccg 5880
atcacgagcg catcgaaaac gacatccgca ccatgcctga ttacttcgtt ggctacgaag 5940
tcgaagtcaa cttcatcgac gaagcaacct tcgactccga gcacaccggc atgccacacg 6000

gtggccacgt gattaccacc ggcgacaccg gtggcttcaa ccacaccgtg gaatacatcc 6060

tcaagctgga ccgaaaccca gatttcaccg cttcctcaca gatcgctttc ggtcgcgcag 6120

ctcaccgcat gaagcagcag ggccaaagcg gagctttcac cgtcctcgaa gttgctccat 6180

acctgctctc cccagagaac ttggacgatc tgatcgcacg cgacgtctaa ccc 6233

<210> 83

<211> 7

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> secuencia de enlazamiento de ribosoma

<400> 83

aggagga

<210> 84

<211> 1365

<212> ADN

<213> corynebacterium glutamicum

<220>

<221> características_misceláneas

<223> RAX077

<400> 84

atgaatgatg agaatattca aagctccaac tatcagccat tcccgagttt tgacgattgg 60
aaacagatcg aggtgtcgct cttagatgtc atcgaatcct cacgccattt ttctgatttg 120
aaagatagca ctgatcgttc tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180
gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcggttt tacccataca 240
gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300
cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360
actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420
agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480
aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540
gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600
gcagccgaga aggttattca agctgcctat gcccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720
cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaatc tggttcggct 900
aagctttcgg atgcgctacg ccccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
aggctccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt ccccattcaa tctgccagag 1080
ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgaccttag ctttcaatag caactctcca 1140
aaacaaatct tccacccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200
agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260
gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320
gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

REIVINDICACIONES

1. Bacteria corineforme genéticamente modificada, transformada con al menos un vector que contiene al menos un casete de expresión, en cuyo caso el casete de expresión comprende en dirección 5’ -3’ un módulo de secuencia de la siguiente fórmula general II:

5’ -P_1-(-A_x-P_x-)$_n$-A_y-P_y-G-3’ (II)

Donde

n representa un valor de número entero de 0 a 10,

A_x y A_y son iguales o diferentes y representan un enlace químico o una secuencia de ácido nucleico enlazante;

P_1, P_x y P_y codifican secuencias de promotores iguales o diferentes derivadas de bacterias corineformes iguales o diferentes, que comprenden al menos un segmento que enlaza polimerasa de ARN;

y al menos P_y comprende un segmento de secuencia terminal 3’ que facilita el enlace ribosómico,

G representa al menos una secuencia de ácido nucleico codificante que está enlazada funcionalmente con la secuencia regulatoria ubicada corriente arriba de 5’.

2. Bacteria corineforme genéticamente modificada según la reivindicación 1, en cuyo caso las bacterias corineformes son bacterias del género corynebacterium o brevibacterium.

3. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 o 2, que contiene al menos un casete de expresión en forma integrada.

4. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 a 3, en cuyo caso P_1, P_x y P_y presentan una identidad hacia la secuencia de partida de al menos 80% o son secuencias de promotores artificiales.

5. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 a 4, en cuyo caso P_1, P_x y P_y se derivan respectivamente de una secuencia continua de 35 a 500 residuos de nucleótido, la cual se encuentra en el genoma del organismos corriente arriba de 5’ de la secuencia que codifica una proteína y presenta una identidad de al menos 80% con la secuencia de partida.

6. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 a 5, en cuyo caso P_1, P_x y P_y se seleccionan independientemente entre sí entre las secuencias de promotores para la secuencia codificante de una proteína con alta abundancia en un organismo.

7. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 a 6, en cuyo caso P_1, P_x y P_y independientemente entre sí se selecciona entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

8. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 a 7, en cuyo caso los promotores se seleccionan entre promotores fuertes, constitutivos o regulables.

9. Bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1-8, en cuyo caso G se selecciona entre

a. ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía biosintética aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos,

b. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos,

c. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos,

d. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos,

e. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de dioles,

f. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de carbohidratos,

g. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos,

h. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de vitaminas,

i. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de cofactores y

j. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir de la vía de biosíntesis de enzimas.

k. ácidos nucleicos que codifican una proteína a partir del metabolismo central.

10. Bacteria corineforme genéticamente modificada, según la reivindicación 9a) en cuyo caso los ácidos nucleicos que codifican proteínas de la vía biosintética, seleccionadas entre cinasa de aspartato, aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, diaminopimelato-deshidrogenasa, diaminopimelato-descarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinatos-reductasa, glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, 3-fosfoglicerato-cinasa, piruvato-carboxilasa, triosafosfato-isomerasa, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, malato-quinona-oxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metilen-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-cinasa, treonina-sintasa, exportador-portador de treonina, treonina-deshidratasa, piruvato-oxidasa, exportador de lisina, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionina – sintasa dependiente de coenzima B12, actividad de metionina-sintasa independiente de coenzima B12, sulfatadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910-R, arginil-ARN-t-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína treonina Efflux, serinahidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-afosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructocinasa, 6-fosfofrutocinasa, tetrahidropicolinato-succinilasa, succinilo-aminocetopimelato-aminotransferasa, succinil-diaminopimelato-desuccinilasa, diaminopimelato-epimerasa, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, glucosafosfato-isomerasa, fosfoglicerato-mutasa, enolasa, piruvato-cinasa, aspartato-transaminasa, y malato-enzima.

11. Método para producir un producto biosintético, en cuyo caso se cultiva una bacteria corineforme genéticamente modificada según una de las reivindicaciones 1 a 10 y se aísla del cultivo el producto deseado.

12. Método según la reivindicación 11, en cuyo caso el producto biosintético se selecciona entre ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos y nucleósidos, aminoácidos tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, enzimas y proteínas.

Figura 1

A) pEFTu

>EFTU\rxa01284\
ggccgttaccctgcgaatgtccacagggtagctggtagtttgaaaatcaacgccgttgccctaggattca
gtaactggcacattttgtaatgcgctagatctgtgtgctcagtcttcaggctgcttatcacagtgaaagc
aaaaccaattcgtggctgcgaaagtcgtagccaccacgaagtccaggaggacataca

ggccgttaccctgcgaatgtccacagggtagctggtagtttgaaaatcaacgccgttgccctaggattca
gtaactggcacattttgtaatgcgctagatctgtgtgctcagtcttcaggctgcttatcacagtgaaagc
aaaaccaattcgtggctgcgaaagtcgtagccac**CACGAAGTCC**

B) pGRO

>groES\rxa00497\
cggcttaaagtttggctgccatgtgaatttttagcaccctcaacagttgagtgctggcactctcggggg
tagagtgccaaataggttgtttgacacacagttgttcacccgcgacgacggctgtgctggaaacccacaa
ccggcacacacaaaatttttctcatggaggattcatc

cggcttaaagtttggctgccatgtgaatttttagcaccctcaacagttgagtgctggcactctcggggg
tagagtgccaaataggttgtttgacacacagttgttcacccgcgacgacggctgtgctggaaacccacaa
ccggcacacacaaaat**TTTTCTCAT**

C) pEFTs

>elongationsfaktor \rxa01913\
cccccacgacaatggaactttgacttttaaaatttcatcgccgtgggggctttttgggcacagcccgc
cgtgtcgcaacgtaatcgactgaatacctgtacgatcacttttttagacgggcggtagggctactgtgcc
ctaacctaagcttgtaaagcattaattatccatacataaggaggatcgccccgta

cccccacgacaatggaactttgacttttaaaatttcatcgccgtgggggctttttgggcagccagcccgc
cgtgtcgcaacgtaatcgactgaatacctgtacgatcacttttttagacgggcgggtagggctactgtgcc
ctaacctaagcttgtaaagcattaattatccatacata

D) pSOD

>superoxid\dismutase\rxa03119\
agctgccaattattccgggcttgtgacccgctacccgataaataggtcggctgaaaatttcgttgcaat
atcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtcgcaccaagtacttttggaagcgccatctgacggattt
tcaaaagatgtatatgctcggtgcggaaacctacgaaaggattttttaccc

agctgccaattattccgggcttgtgacccgctacccgataaataggtcggctgaaaaatttcgttgcaat
atcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtcgcaccaagtacttttgcgaagcgccatctgacggattt
tcaaaagatgtatatgctcggtgcggaaacctac**C**