

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 039**

51 Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05822237 .3**
96 Fecha de presentación: **16.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1824977**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Ácido nucleico promotor obtenido a partir del género corynebacterium, casete de expresión que comprende el promotor y vector, célula hospedadora que comprende el vector, vector y método para expresión de un gen que utiliza la célula**

30 Prioridad:
16.12.2004 KR 20040107215

45 Fecha de publicación de la mención BOP:
08.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2012

73 Titular/es:
**CJ CHEILJEDANG CORPORATION
500, NAMDAEMUNRO 5-GA
JUNG-GU SEOUL, KR**

72 Inventor/es:
**PARK, Young-Hoon;
KIM, Hyun-Soo;
CHOI, Hye-Jin;
LEE, Jin-Ho;
HWANG, Soo-Youn;
SIM, Jae-Ick;
KANG, Tae-Sun y
LEE, Won-Sik**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 380 039 T3

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico promotor obtenido a partir del género *Corynebacterium*, casete de expresión que comprende el promotor y vector, célula hospedadora que comprende el vector, vector y método para expresión de un gen que utiliza la célula.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo ácido nucleico promotor derivado de bacterias del género *Corynebacterium*, una casete de expresión que incluye el mismo, un vector que incluye la casete de expresión, una célula hospedadora que incluye un vector, y un método de expresión de un gen que utiliza la célula hospedadora.

Técnica anterior

- 10 Las bacterias corineformes son microorganismos utilizados para producir diversos materiales químicos utilizados en muchas aplicaciones, tales como piensos animales, medicinas, y alimentos que incluyen L-lisina, L-treonina, y diversos ácidos nucleicos. Una cepa de bacterias corineformes que exhibe productividad alta puede desarrollarse por ingeniería genética e ingeniería metabólica. Para obtener una cepa de este tipo de bacterias corineformes que exhiben productividad alta, es necesario expresar en las bacterias corineformes un gen relacionado con diversos caminos metabólicos. A este fin, es preciso desarrollar un promotor adecuado.

- Generalmente, en las bacterias corineformes, se expresa un gen bajo un promotor incluido inherentemente en ellas. (Véase, por ejemplo, *Journal of Bacteriology*, 181 (19), 6188-6191, 1999). Entretanto, la estructura de una secuencia promotora para expresión de un gen de bacterias corineformes se desconoce, mientras que las estructuras de otros microorganismos industriales, tales como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, son conocidas. Por esta razón, se ha sugerido el método siguiente para producir promotores que permitan la expresión de un gen en bacterias corineformes. En primer lugar, se elimina una región promotora de un gen que es resistente a un antibiótico, tal como cloranfenicol. Por separado, se escinde un DNA cromosómico separado de bacterias corineformes utilizando una enzima de restricción adecuada, y el fragmento resultante se introduce en el gen del que se ha eliminado la región promotora. A continuación, se utiliza el gen obtenido para transformar bacterias corineformes a fin de producir una cepa transformada y se mide la resistencia a los antibióticos de la cepa transformada: (véase *Gene* 102, 93-98, 1991; *Microbiology*, 142, 1297-1309, 1996.) En particular, se han desarrollado un número muy pequeño de promotores utilizados en *Corynebacterium ammoniagenes*, un microorganismo productor de ácido nucleico conocido. Por ejemplo, se utiliza un promotor que tiene aproximadamente una actividad 10% mayor que un promotor *tac* en *E. coli* (véase *Biotechnol. Lett.* 25, 1311-1316, 2003.) Sin embargo, cuando se utiliza el mismo en una expresión másica de genes, un promotor de este tipo exhibe eficiencia baja. La Patente U.S. No. 5.593.781 describe un DNA promotor que se separa de una cepa de *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) y tiene mayor actividad que un promotor *tac*. Sin embargo, un DNA promotor de este tipo que está separado de un género de *Brevibacterium* puede no ser operativo en otras bacterias. Por consiguiente, es necesario desarrollar una secuencia promotora que se derive de *Corynebacterium ammoniagenes* disponible comercialmente, y tenga actividad elevada en otras bacterias.

- 35 De acuerdo con lo anterior, los autores de la presente invención buscaron una secuencia promotora fuerte en *Corynebacterium ammoniagenes* y encontraron que un promotor de acuerdo con la presente invención puede expresar genes con actividad elevada en *Corynebacterium ammoniagenes*.

Descripción de los dibujos

- 40 FIG. 1 muestra los resultados de un ensayo de electroforesis bidimensional de una muestra extraída de una bacteria *Corynebacterium ammoniagenes*, en donde los resultados del ensayo se tiñeron con plata y se revelaron para identificación;

FIG. 2 ilustra un método de producción de un vector de cribado de p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención; y

- 45 FIG. 3 ilustra un método de producción de un vector recombinante que incluye la secuencia promotora pcj1 a pcj7 de un vector derivado p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

La presente invención proporciona un promotor que tiene actividad alta en *Corynebacterium*.

- 50 La presente invención proporciona también una casete de expresión que incluye el promotor y un vector que incluye la casete de expresión.

La presente invención proporciona también una célula hospedadora que incluye el vector.

La presente invención proporciona también un método de expresión de un gen que utiliza la célula hospedadora.

Solución técnica

La presente invención proporciona un promotor que comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 1.

El promotor de acuerdo con una realización de la presente invención es un ácido nucleico aislado y tiene actividad promotora. En esta memoria, el término "promotor" hace referencia a una región de DNA a la cual se une una RNA-polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El término "promotor tac" se refiere a un promotor obtenido por fusión de una secuencia obtenida a partir de la región -35 de un promotor del operón triptófano de *E. coli* y una secuencia obtenida a partir de la región -10 de un promotor del operón lactosa de *E. coli*. Es sabido que el promotor tac tiene una alta actividad promotora. Un promotor que tiene al menos un ácido nucleico seleccionado de SEQ ID NO: 1, 4, 5, 6 y 7 tiene mayor actividad en bacterias del género *Corynebacterium* que el promotor tac. En particular, un promotor que tiene al menos un ácido nucleico seleccionado de SEQ ID NOs: 1 y 4 tiene una actividad 10 veces mayor que el promotor tac en bacterias del género *Corynebacterium*.

El promotor de acuerdo con una realización de la presente invención tiene actividad promotora en bacterias del género *Escherichia*, adicionalmente a bacterias del género *Corynebacterium*. En particular, el promotor que contiene SEQ ID NO: 1 exhibe una actividad promotora dos veces mayor que el promotor tac incluso en bacterias del género *Escherichia*.

La célula en la cual puede funcionar el promotor de la presente invención puede ser cualquier bacteria del género *Corynebacterium*. Ejemplos de bacterias del género *Corynebacterium* incluyen *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y ATCC 6871, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y ATCC 13060, y análogas. Sin embargo, las bacterias del género *Corynebacterium* no se limitan a las anteriores. Ejemplos de bacterias del género *Escherichia* en las cuales puede funcionar un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención, incluyen *E. coli*.

La secuencia del promotor de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser modificada fácilmente por una persona que tenga experiencia ordinaria en la técnica mediante un proceso de mutagénesis conocido, tal como evolución orientada y mutagénesis orientada. De acuerdo con ello, un ácido nucleico que tiene, por ejemplo, 70% o más de homología, preferiblemente 80% o más de homología, y más preferiblemente, 90% o más de homología, incluyendo la secuencia aislada del promotor al menos un ácido nucleico seleccionado de SEQ ID NO: 1, y puede actuar como un promotor en bacterias del género *Corynebacterium* está incluido en el alcance de la presente invención.

La presente invención proporciona también una casete de expresión que incluye el promotor que está enlazado operativamente a una secuencia codificante. La secuencia codificante puede ser, por ejemplo, el gen entero o una secuencia codificante que codifica una región predeterminada del gen. En esta memoria, el término "enlazado operativamente" indica que la secuencia codificante está conectada funcionalmente al promotor de tal modo que la secuencia promotora puede iniciar o mediar la transcripción de la secuencia codificante. La casete de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir adicionalmente secuencias de control 5' y 3' enlazadas operativamente a la secuencia promotora. La secuencia codificante puede ser un gen asociado con un producto metabólico, tal como IMP, GMP, L-lisina y L-treonina.

La presente invención proporciona también un vector que incluye la casete de expresión de acuerdo con una realización de la presente invención. En este caso, el vector no está limitado, y puede ser cualquier vector conocido en la técnica. Ejemplos del vector de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluyen un vector pCR2.1-TOPO (producido por Invitrogen Inc., EE.UU.) y pECCG117 (KFCC-10673). Sin embargo, el vector no se limita a los mismos. Ejemplos del vector que incluyen la casete de expresión de acuerdo con una realización de la presente invención incluyen p117-cj1-gfp, p117-cj2-gfp, p117-cj3-gfp, p117-cj4-gfp, p117-cj5-gfp, p117-cj6-gfp y p117-cj7-gfp.

La presente invención proporciona también una célula hospedadora que incluye el vector de acuerdo con una realización de la presente invención. La célula hospedadora puede ser una bacteria del género *Corynebacterium* o una bacteria del género *Escherichia*, pero no se limita a las mismas. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) o *E. coli*.

La presente invención proporciona también un método de expresión de un gen exógeno por cultivo de la célula hospedadora. La célula hospedadora se cultiva en uno de varios medios de cultivo conocidos y en varias condiciones de cultivo conocidas de acuerdo con la célula hospedadora seleccionada.

Efectos ventajosos

Un gen que está enlazado operativamente a un promotor de acuerdo con la presente invención se expresa eficientemente en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes*. El promotor es adecuado para desarrollar una cepa utilizando bacterias del género *Corynebacterium*.

Una casete de expresión que incluye el promotor de acuerdo con la presente invención y un vector que incluye la casete de expresión de acuerdo con la presente invención son adecuados para expresar eficientemente un gen exógeno en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes*.

Una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención puede expresar eficientemente un gen exógeno.

- 5 Utilizando un método de expresión de un gen de acuerdo con la presente invención, puede expresarse eficientemente un gen exógeno.

Modo óptimo

- 10 La presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos que siguen. Estos ejemplos tienen por objeto únicamente propósitos ilustrativos, y no deben considerarse como limitantes del alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

- 15 Se prepararon extractos bacterianos de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) en diversas etapas de cultivo. Se llevó a cabo una electroforesis bidimensional sobre los extractos bacterianos a fin de encontrar las proteínas sobreexpresadas en ellos, las cuales se escindieron luego para analizar las secuencias peptídicas. Las secuencias peptídicas obtenidas se utilizaron para identificar genes de las proteínas sobreexpresadas. A continuación, se aislaron las regiones promotoras, y se produjeron vectores utilizando las regiones promotoras. Seguidamente, se midieron las actividades del promotor en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y *E. coli*.

Ejemplo 1: Cultivo de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y selección de la proteína de sobreexpresión de acuerdo con las etapas de cultivo

- 20 (1) Cultivo de Bacterias

- Se cultivaron *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) en un medio que contenía azúcar de melazas bruto (mixtura que contiene 50% de glucosa y 50% de fructosa). En este momento, se midió la concentración de células. Muestras de la cepa cultivada de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) se cosecharon en una fase estacionaria temprana y fases estacionarias. Las muestras se centrifugaron y se eliminó la solución superior resultante. El sedimento de células obtenido se lisó en un tampón de desintegración para producir aproximadamente 10 µm de un extracto bacteriano.

(2) Ensayo de Electroforesis Bidimensional

- 30 El extracto bacteriano obtenido de la Sección (1) se diluyó utilizando urea 6M, tiourea 2M, 4% CHAPS, y 0,4% DTT para obtener una mixtura con un volumen total de 1150 µl. A continuación, se añadieron a lo anterior 7 µl de un tampón IPG y 3 µl de azul de bromofenol (BPB) al 1%. La solución resultante se cargó en una bandeja de rehidratación utilizando una tira seca Immobiline en gradiente de pH. La muestra contenida en la bandeja de rehidratación se cubrió con 2 ml de un líquido de cobertura para prevenir la vaporización de la muestra y la cristalización de la urea, y se rehidrató luego a la temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas.

- 35 El gel en tira rehidratada se sometió a enfoque isoelectrico a 20°C a 0-100 V durante 1 hora, a 300 V durante 1 hora, a 600 V durante 1 hora, y a 8000 V durante un tiempo predeterminado, que se ajustó para realizar el enfoque a 43-97 kVhr (pH 4-7: 43,4 kVhr, pH 4,5-5,5, pH 5,5-6,7: 97 kVhr) utilizando un dispositivo de enfoque isoelectrico (Multiphor II: producido por Amersham Bioscience, EE.UU.).

- 40 Cuando se completó el enfoque isoelectrico, los geles en tira respectivos se equilibraron en una solución de pH 8,8 que contenía 20 mM Tris-HCl, 6 M urea, 2% SDS, 20% glicerol, 2,5% acrilamida y 5 mM TBP durante 15 minutos. Las tiras equilibradas respectivas se cargaron en un gel bidimensional (gradiente de concentración 9-16%)) y se sellaron luego con una solución de SDS que contenía 0,5% de agarosa, teniendo un punto de ebullición bajo y 0,001% de BPB. La electroforesis se realizó a 100 V durante aproximadamente 19 horas.

- 45 Una vez completada la electroforesis, se inmovilizó el gel en una solución metanólica al 45% y solución de ácido acético al 5%. El ácido acético se lavó durante 1 hora utilizando agua destilada. Se sensibilizó el gel con 0,02% de tiosulfato de sodio durante 2 minutos y se lavó con agua destilada. A continuación, se hizo reaccionar el gel con nitrato de plata al 0,1% durante 20 minutos y se lavó con agua destilada. El producto de reacción se reveló con una solución que contenía 2% (p/v) de carbonato de sodio y 0,04% (v/v) de formaldehído. Cuando apareció una mancha que tenía la concentración deseada, se paró la reacción utilizando ácido acético al 1%. Se lavó el gel con agua destilada y se guardó en una bolsa de plástico sellada a 4°C.

- 50 Cuando se utilizó tinción con Coomassie, después que se hubo completado la electroforesis, el gel se fijó utilizando una solución metanólica al 30% y una solución de ácido acético al 10% durante 1 hora, se lavó con agua destilada, se tiñó con Coomassie coloidal brillante G-250 durante 24 horas, y se decoloró luego con una solución metanólica al 10% y una solución de ácido acético al 7% durante 4 horas.

(3) Preparación de la muestra peptídica utilizada para espectrometría de masas basada en manchas

Se separó el péptido de las manchas utilizando una versión modificada de un método conocido (Shevchenko et al., Anal. Chem., 68 (5), 850-8, 1996.)

5 En primer lugar, se escindió una mancha de proteína del gel preparado en la Sección (2), se decoloró en 120 μ l de una solución mixta de ferricianuro de potasio 30 mM y 100 mM de tiosulfato de sodio a una ratio de 1:1, y se lavó con agua destilada y después con 120 μ l de acetonitrilo al 50%/bicarbonato de amonio 25 mM (pH 7,8) durante 10 minutos. El producto resultante se hizo reaccionar con 50 μ l de acetonitrilo al 100% hasta que hubo aparecido un color blanco durante aproximadamente 5 minutos, después de lo cual se secó a vacío.

10 Se añadieron 10 μ l de tripsina bidimensional de grado electroforesis (0,02 μ g/ μ l) a las manchas secas y se dejaron reaccionar luego en hielo durante 45 minutos. A continuación, se añadieron al producto de reacción 50 mM de un tampón de bicarbonato de amonio (pH 7,8) y se dejaron reaccionar a 37°C durante 12-14 horas. El producto resultante se trató 3 veces con ondas ultrasónicas durante 10 minutos en 10 μ l de TFA al 0,5% y acet onitrilo al 50% para extraer un péptido.

(4) Espectrometría de Masas

15 El péptido extraído como se ha descrito arriba se ensayó por HPLC-MS/MS. La HPLC-MS/MS se realizó con un sistema HPLC serie 1100 (producido por Agilent Inc., EE.UU.) y un dispositivo de espectrometría de masas con trampa iónica Finnigan LCQ DECA (producido por ThermoQuest, EE.UU.) en el cual se instaló una fuente ionizada nanospray. La HPLC se realizó con una columna de base inversa C18 microsonda, ácido fórmico al 0,1% (disolvente A) y solución (disolvente B) de acetonitrilo al 90% (v/v) y se proporcionó ácido fórmico al 0,1% en un gradiente lineal
20 (caudal = 1 μ l/min) para aislar un péptido.

La detección del péptido se realizó 3 veces utilizando ionización nanospray (NSI) (voltaje de pulverización: 1,8 kV; temperatura del capilar: 200°C; voltaje del capilar: 34 V; compensación de la lente del tubo: 40 V; y multiplicador electrónico: -60 V). Las medidas se obtuvieron en una modalidad centroide. Después que se obtuvo el escaneo MS completo de 400-2000 Da, se ajustó un valor umbral a 1×10^5 cuentas y los iones más fuertes se separaron median-
25 te un barrido de zoom de alta resolución. A continuación, se realizó la disociación inducida por colisiones (CID) MS/MS. La secuencia de un espectro CID que no estaba codificado se identificó utilizando software TurboQuest (producido por Thermo Finnigan Inc., EE.UU.). Los resultados de una búsqueda SEQUEST se identificaron por correlación cruzada y ΔC_n (correlación normalizada delta).

30 La secuencia de un aminoácido del péptido se confirmó y se identificó utilizando Q-star Pulsar LC MS/MS (producido por Applied Biosystems Inc., EE.UU.).

Como resultado, se encontraron 50 proteínas, y se seleccionaron siete proteínas sobreexpresadas de las 50 proteínas. FIG. 1 muestra los resultados del ensayo de electroforesis bidimensional de una muestra extraída de una cepa de *Corynebacterium ammoniagenes*, en la cual los resultados del ensayo se tiñeron con plata y se revelaron para
35 identificación. En FIG. 1, se identificaron 7 manchas sobreexpresadas designadas por CJ1 a CJ7. Las funciones de estas siete proteínas sobreexpresadas se indican en la Tabla 1. Las funciones de estas proteínas se identificaron por comparación de la secuencia del péptido con una secuencia de aminoácidos contenida en la base de datos del banco de genes NCBI.

Tabla 1

Nombre de la Mancha	Proteína	No. de Acceso al banco de genes
	Proteína del choque térmico hsp60	AE008903.1
	5-carboximetil-2-hidroximuconato semialdehído deshidrogenasa	NC-006461.1
	Homoprotocateculato 2,3-dioxigenasa	NC-005835.1
	Factor de extensión de traducción temporal EF-Tu	YP-145957
	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	AAA69094
	Cisteína sintasa	AAV89445
	Manganeso superóxido dismutasa	NP-940564

Se asumió una secuencia de genes a partir de las siete proteínas sobreexpresadas y se analizó para seleccionar una región promotora. Como resultado, se asumió que los oligonucleótidos de SEQ ID NOs: 1 a 7 separados de la secuencia de genes correspondiente a las proteínas designadas por CJ1 a CJ7 tienen actividad promotora.

Ejemplo 2: Fabricación del vector recombinante p117-cj1-7-gfp que tiene secuencia promotora y confirmación de la actividad promotora en *Corynebacterium ammoniagenes*

(1) Amplificación de la secuencia promotora del genoma de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

Se separaron 500 µg de DNA cromosómico de 25 ml de un cultivo de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 incubado durante 1 día, utilizando un método sugerido por Eikmann et al. (Gene, 102, 93-98, 1991). El DNA cromosómico separado se utilizó como molde. Se realizaron PCRs utilizando juegos de cebadores (SEQ ID NOs: 10 y 11, 12 y 13, 14 y 15, 16 y 17, 18 y 19, 20 y 21, y 22 y 23) para amplificar los promotores de CJ1 a CJ7 durante 30 segundos a 94°C, a 55°C, y a 72°C, repetidos 30 veces, respectivamente. Como resultado, se amplificaron las secuencias promotoras respectivas pcj1 a pcj7.

(2) Fabricación del vector de cribado

En primer lugar, se realizaron PCRs utilizando un vector pGFuv (producido por Clontech Inc., EE.UU.) como molde y utilizando SEQ ID NOs: 8 y 9 como cebador a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 1 minuto, respectivamente. La PCR se realizó 30 veces a cada temperatura. Como resultado, se amplificó un gen de proteína verde fluorescente (GFP) que no incluía una región promotora. A continuación, el gen GFP obtenido que no incluía una región promotora se clonó en vectores pCR2.1-TOPO (producidos por Invitrogen, EE.UU.), que fueron escindidos luego por *Pst*I y *Eco*RI y se introdujeron en el sitio *Pst*I y *Eco*RI de pECCG117 (KFCC-10673/KFCC-10674), que es un vector lanzadera y puede expresarse en *E. coli* y bacterias corineformes. El resultado se utilizó como vector de cribado (p117-gfp) para separar el promotor. FIG. 2 ilustra un método de producción del vector de cribado de p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención.

(3) Introducción de la secuencia promotora en el vector de cribado e identificación de la actividad promotora en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

El vector de cribado obtenido en la Sección (2) se escindió con una enzima de restricción de *Kpn*I/*Eco*RV y se ligó luego a las secuencias promotoras de pcj1 a pcj7 que se habían sido escindidas por la misma enzima de restricción a fin de producir vectores recombinantes de p117-cj1-7-gfp en los cuales los oligonucleótidos de pcj1 a pcj7, que se separaron de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 y tenían la actividad promotora asumida, se ligaron a la GFP. FIG. 3 ilustra un método de producción de un vector recombinante que incluye SEQ ID NOs: pcj1 a pcj7 a partir del vector de cribado p117-gfp de acuerdo con una realización de la presente invención.

El vector recombinante obtenido se introdujo en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) lista para transformación por un método introducido por van der Rest et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 541-545, 1999).

La cepa transformada resultante se extendió sobre un medio CM (1% peptona, 1% caldo, 0,25% cloruro de sodio, 1% extracto de levadura, 100 mg/ml adenina, 100 mg/ml guanina, 2% agar (pH 7,2)) que contenía 10 µg/ml de kanamicina y se cultivó a 32°C durante 3 días. Una cepa viable que exhibía crecimiento se separó de las colonias por cribado. A continuación, se radió luz ultravioleta sobre la cepa cribada y se seleccionaron cepas que irradiaban fluorescencia.

El cribado de las cepas que irradiaban fluorescencia indica que los promotores de pcj1 a pcj7 exhiben actividad promotora en una bacteria corineforme.

Entretanto, se midió cuantitativamente la actividad promotora. El vector recombinante de p117-cj1-7-gfp se introdujo en *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330) y se cultivó del mismo modo que se ha descrito arriba. El cultivo se centrifugó para obtener un sedimento de bacterias. A continuación, el sedimento bacteriano se suspendió en un tampón de extracto proteínico (EDTA 1 mM de PBS, 3% glicerol, solución Triton-X-100 al 1%, pH-7,5) y se lisó por tratamiento con ultrasonidos. El lisado se centrifugó y se separó la solución superior resultante que contenía un extracto bacteriano. La cantidad de la proteína contenida en extracto bacteriano se midió por el método de ensayo Bradford. Subsiguientemente, se irradió luz de 488 nm sobre un extracto bacteriano igual en cantidad al extracto bacteriano arriba descrito utilizando un método introducido por Laure Gory et al. (FEMS Microbiology Letters 194, 127-133, 2001) y la luz emitida se midió utilizando un espectrofotómetro LS-50B (Perkin-Elmer) para encontrar un grado de expresión del gen GFP, y se encontró que tenía una longitud de onda de 511 nm.

Los resultados se presentan en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención dirige una expresión eficiente de un gen GFP. Más particularmente, los promotores de pcj1 y pcj4 exhibían la eficiencia máxima comparados con los otros promotores.

Tabla 2

Promotor	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7
	12309	437	479	11790	1363	5651	2493

Ejemplo 3: Comparación de las actividades del promotor tac y el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención en *Corynebacterium ammoniagenes*

- 5 En el presente experimento, se compararon las actividades de un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención y un promotor tac que se utiliza convencionalmente en *Corynebacterium ammoniagenes*.

(1) Fabricación del vector que contiene la secuencia del promotor tac y el gen GFP combinados

- 10 En primer lugar, se realizó una PCR utilizando un vector pKK223-2 (producido por Pharmacia Biotech, EE.UU.) como molde y utilizando SEQ ID NOS: 24 y 25 como cebador del mismo modo que en el Ejemplo 1 para amplificar la secuencia del promotor tac. El producto amplificado se clonó en un vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, EE.UU.). A continuación, la secuencia del promotor tac obtenida se escindió con las enzimas de restricción *KpnI* y *McoRV* y se ligó a p117gfp que se había escindido con las mismas enzimas de restricción para obtener un vector de expresión recombinante (p117-tac-gfp.)

- 15 El vector recombinante se utilizó para transformar *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 de la misma manera que en el Ejemplo 1, y se midió la actividad de un gen GFP. La actividad del gen GFP debida al promotor tac se comparó con la actividad del gen GFP debida al promotor seleccionado de acuerdo con el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Promotor	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7	Ptac
	1140%	40 %	44 %	1092 °A,	126 %	523%	231%	100%

- 20 Como se muestra en la Tabla 3, se encontró que un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención expresaba eficientemente un gen GFP. Adicionalmente, cuando se compara la actividad de los promotores de acuerdo con una realización de la presente invención en *Corynebacterium ammoniagenes* con la actividad del promotor tac en *Corynebacterium ammoniagenes*, los promotores pcj1 pcj4, pcj5, pcj6 y pcj7 exhibían mayores intensidades que el promotor tac. En particular, los promotores de pcj1 y pcj4 exhibían 10 veces la actividad del promotor tac.

Ejemplo 4: Confirmación de la actividad del promotor de acuerdo con la presente invención en *E. coli*

Se confirmó que el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención exhibía actividad en *E. coli* además de bacterias corineformes. Se transformó *E. coli* con el vector de expresión recombinante utilizado en los Ejemplos 1 y 2.

- 30 Se determinó si el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención permite una expresión eficiente del gen GFP en *E. coli* por medida de la actividad del gen GFP del mismo modo que en el Ejemplo 1. Un vector de referencia era un vector recombinante que contenía el promotor tac de p117-tac-gfp. La Tabla 4 muestra la actividad promotora de los promotores de acuerdo con realizaciones de la presente invención en *E. coli*.

Tabla 4

Promotor	pcj1	pcj2	pcj3	pcj4	pcj5	pcj6	pcj7	ptac
	296%	15%	20%	17%	19%	24%	24%	100%

35 Como se muestra en la Tabla 4, se encontró que el promotor de acuerdo con una realización de la presente invención expresaba eficientemente el gen GFP en *E. coli*. Más particularmente, el promotor pcj1 exhibía actividad alta tanto el bacterias corineformes como en *E. coli*.

Ejemplo 5: Efectos de IPTG sobre la actividad del promotor de acuerdo con la presente invención

Es bien sabido que un promotor tac es un promotor representativo por el cual la expresión génica puede ser inducida por IPTG (isopropiltio- β -D-galactosido) en *E. coli*. Dicho de otro modo, en *E. coli*, la cantidad de un gen expresada por el promotor tac varía de acuerdo con la presencia o ausencia de IPTG.

5 En el presente experimento, se midieron los efectos de IPTG sobre la expresión de un gen GFP por un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención. A este fin, un vector recombinante que contenía el promotor pcj1 que tiene mayor actividad que los otros promotores de p117-cj1-gfp se introdujo en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KCCM-10330), de la misma manera que en los Ejemplos 1 y 2, y se midió la cantidad del gen GFP expresada de este modo. La referencia era un vector recombinante que contenía el promotor tac de p117-tac-gfp.

10 Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Célula hospedadora	Corynebacterium ammoniagenes CJHB100				E.coli			
Inducción	Inducción por IPTG		Sin inducción		Inducción por IPTG		Sin inducción	
Promotor	ptac	pcj1	ptac	pcj1	ptac	pcj1	ptac	
Intensidad de fluorescencia	2089	5530	1959	5048	6480	7165	2314	

15 Como se muestra en la Tabla 5, un promotor de acuerdo con una realización de la presente invención expresaba más eficientemente un gen GFP en *E. coli* y *Corynebacterium ammoniagenes* que un promotor tac, con indiferencia de la presencia de IPTG.

20 Los promotores de pCJ1, pCJ2, pCJ3, pCJ4, pCJ5, pCJ6 y pCJ7 obtenidos en los ejemplos arriba descritos se insertaron en pECCG117. Los vectores obtenidos se utilizaron para transformar *E. coli* DH5. Los transformantes resultantes se depositaron en el Centro de Cultura de Microorganismos Coreano (KCCM), que es una organización de depósito internacional de acuerdo con el tratado de Budapest, en fecha 11 de junio de 2004 (números de depósito: KCCM-10611, KCCM-10612, KCCM-10613, KCCM-10614, KCCM-10615, KCCM-10616, y KCCM-10617).

LISTADO DE SECUENCIAS

pctkr2005004338-seq1.app

<110> CJ Corporation

<120> Nuevo ácido nucleico promotor derivado de bacterias del género *Corynebacterium*, casete de expresión que comprende el promotor y vector que comprende la casete, célula hospedadora que comprende el vector y método para expresión de un gen que utiliza la célula

<130> PN05941

<160> 24

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 301

<212> DNA

<213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

<400> 1

caccgcgggc ttattccatt acatggaatg accaggaatg gcagggaatg cgacgaaatt 60

gactgtgtcg ggagcttctg atccgatgct gccaaccagg agagaaaata atgacatgtg 120

caggcacgct ggtgagctgg agatttatga tctcaagtac cttttttctt gcactcgagg 180

gggctgagtg ccagaatggt tgctgacacc aggttgaggt tggtacacac tcaccaatcc 240

tgccgtcgcg ggcgcctgcg tggaacataa accttgagtg aaaccaatc taggagatta 300

a 301

<210> 2

<211> 285

<212> DNA

<213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

<400> 2

aattccacca gacgttggtt agtaagtgcc cgaattctcg gttggtgcag ttgcttttcg 60

atgaatggga gaacctcgaa tacttccgcg tctctacttt ccggtacgtg ccacacagag 120

cagagcaatc ggtggaagag cacgacagat tagtagcgct tatcgaagcc caggcagaag 180

atttctacat cgaatcccaa gcccgcaacc accgcctgac aaccgcaacg acctaccgcc 240

aacgtttaaa ttccgaaaat catcacgaag aacaaggagt gcaca 285

<210> 3

<211> 291

<212> DNA

<213> *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100

<400> 3

gctgcctaca tctggacttc tgacctgaag cgctcccaca acttcgcgca aaacgttgaa 60

gccggcatgg tctggttgaa ctccaacaac gtccgtgacc tgcgcacccc attcggtggc 120

gtcaaggcat ccggtctggg gcatgagggc ggctaccgct ccattgactt ctacaccgac 180

caacaggccg tacacatcaa cttaggcgaa gtccacaacc cagtcttcgg caagcaaacc 240

aactaattct ccctcatcca cactcccctt ttaacctcac taggagtcac c 291

<210> 4

<211> 312

pctkr2005004338-seq1.app

```

<212>    DNA
<213>    Corynebacterium ammoniagenes CJHB100

<400>      4
actgggaggg taggggtcac gctgaattag caggtcacat cctgttgctt gagctggccg      60
ttaccctcct aggatccgag atgattcttg tagaggacta acgtccgcac aaatcttccg      120
cgggatgctc aaatcaccct tagctggttt gaaaaatccg tggcataaat ctaggatcgt      180
gtaactggca cgaaaagaaa gcgtcatcgg cgcttgggaa catcttttta agatattcct      240
caagtgccgt gacatctgtc aaccccgtgg ctgcgagagt cgtagtcaca atgaagtcca      300
ggaggacata ca                                     312

<210>      5
<211>      249
<212>    DNA
<213>    Corynebacterium ammoniagenes CJHB100

<400>      5
tcggacatat acggatttac ctgctgcaat cgcgccggcc cttgctcgaa attgcgtgaa      60
ttttagtctg attgtgttgg aatatccgca gaatgtgtgg gtttgctttt ataaatctgc      120
gcagtgtagg gaacctcggc actatcggca gtgtcggaga aacttcctcg atataaatct      180
ttgaagtaat tctcccaggc aatagctttt gacgtactcc gcttcccaac tttttaggag      240
acaactacc                                     249

<210>      6
<211>      332
<212>    DNA
<213>    Corynebacterium ammoniagenes CJHB100

<400>      6
ggcttcatcg tcgtctttga tccgatgcga gtccattaac ccaaactcct taaagcccgt      60
aaaacggggg tattccaaca cggttatcca cagtttaacc gttattcggg ggtaatccta      120
acccaaatca ttacggaaac tccaatctgg ctcaaatat cctccatgat tctagggaca      180
cccaatcagg tgcacccgct tcctgcgaca acgagtcaaa ctcggaagag ccctcaacct      240
gtcggcttag aatatatata ccgcccggtc tagtgttgtg gtgtacacta acgataaacc      300
aacaaagttg tctattaaga ggaggccatt tc                                     332

<210>      7
<211>      318
<212>    DNA
<213>    Corynebacterium ammoniagenes CJHB100

<400>      7
agaaacatcc cagcgctact aatagggagc gttgaccttc cttccacgga ccggtaatcg      60
gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgcgg ccgggtaatg      120
catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct      180
cctttctggt tttaatcaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac      240
agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtaac      300

```

pctkr2005004338-seq1.app

caacgaaagg aaacactc 318

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 8
acgcgatatc atgagtaaag gagaagatct t 31

<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
aaaactgcag ttatttgtag agctcatcca t 31

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
cggggtacca ccgcgggctt attccattac at 32

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
acgcgatatc ttaatctcct agattgggtt tc 32

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 12
cggggtacca attccaccag acgttggtta gta 33

pctkr2005004338-seq1.app

<210>	13	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	cebador	
<400>	13	
	acgcgatatc tgtgcactcc ttgttcttcg tg	32
<210>	14	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	cebador	
<400>	14	
	cgggggtaccg ctgcctacat ctggacttct gac	33
<210>	15	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	cebador	
<400>	15	
	acgcgatatc gatgactcct agtgagggtta a	31
<210>	16	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	cebador	
<400>	16	
	cgggggtacca ctgggagggt aggggtcac	29
<210>	17	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	cebador	
<400>	17	
	acgcgatatc tgatgtcct cctggacttc	30
<210>	18	
<211>	32	

pctkr2005004338-seq1.app

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador

<400> 18
 cggggtacct cggacatata cggatttacc tg 32

<210> 19
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador

<400> 19
 acgcgatatc gttgtctcct aaaaagttgg g 31

<210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador

<400> 20
 cggggtaccg gcttcacgt cgtct 25

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador

<400> 21
 acgcgatatc atggcctcct cttaatagac 30

<210> 22
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador

<400> 22
 cggggtacca gaaacatccc agcgctacta ata 33

<210> 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

pctkr2005004338-seq1.app

<220>

<223>

cebador

<400> 23

acgcgatatc agtgtttcct ttcgttggg

29

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223>

cebador

<400> 24

cggggyaccc ggagcttata gactgcacg

29

REIVINDICACIONES

1. Un promotor que comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 1.
2. Una casete de expresión, que comprende el promotor de la reivindicación 1 y está enlazada operativamente a una secuencia codificante.
- 5 3. Un vector que comprende la casete de expresión de la reivindicación 2.
4. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 3.
5. La célula hospedadora de la reivindicación 4, que es una célula bacteriana perteneciente a un género *Corynebacterium* o un género *Escherichia*.
- 10 6. Un método de expresión de un gen exógeno que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 4 o la reivindicación 5.

FIG. 1

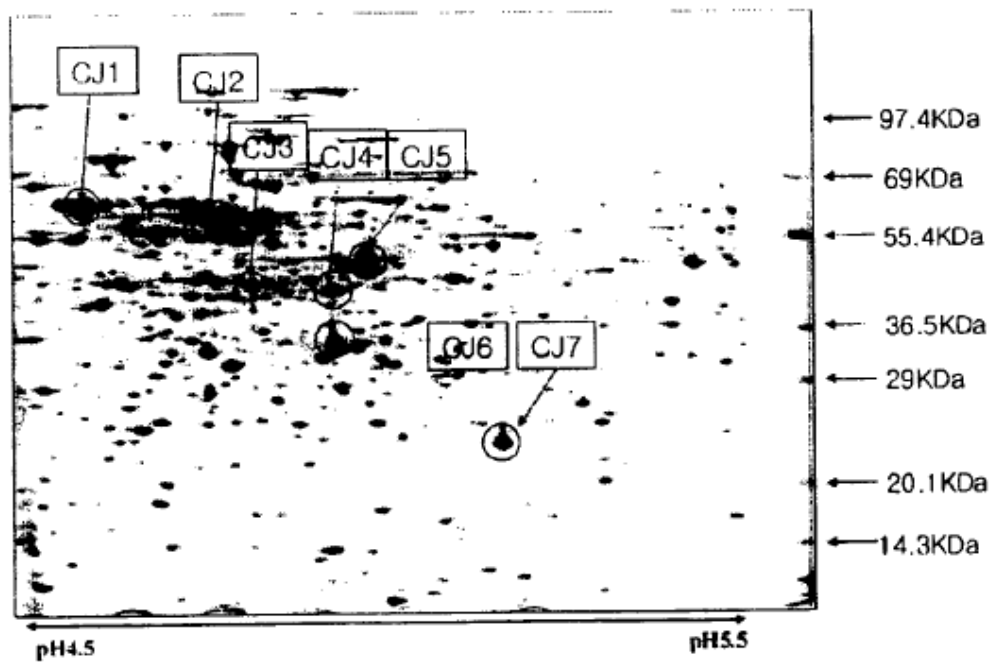


FIG. 2

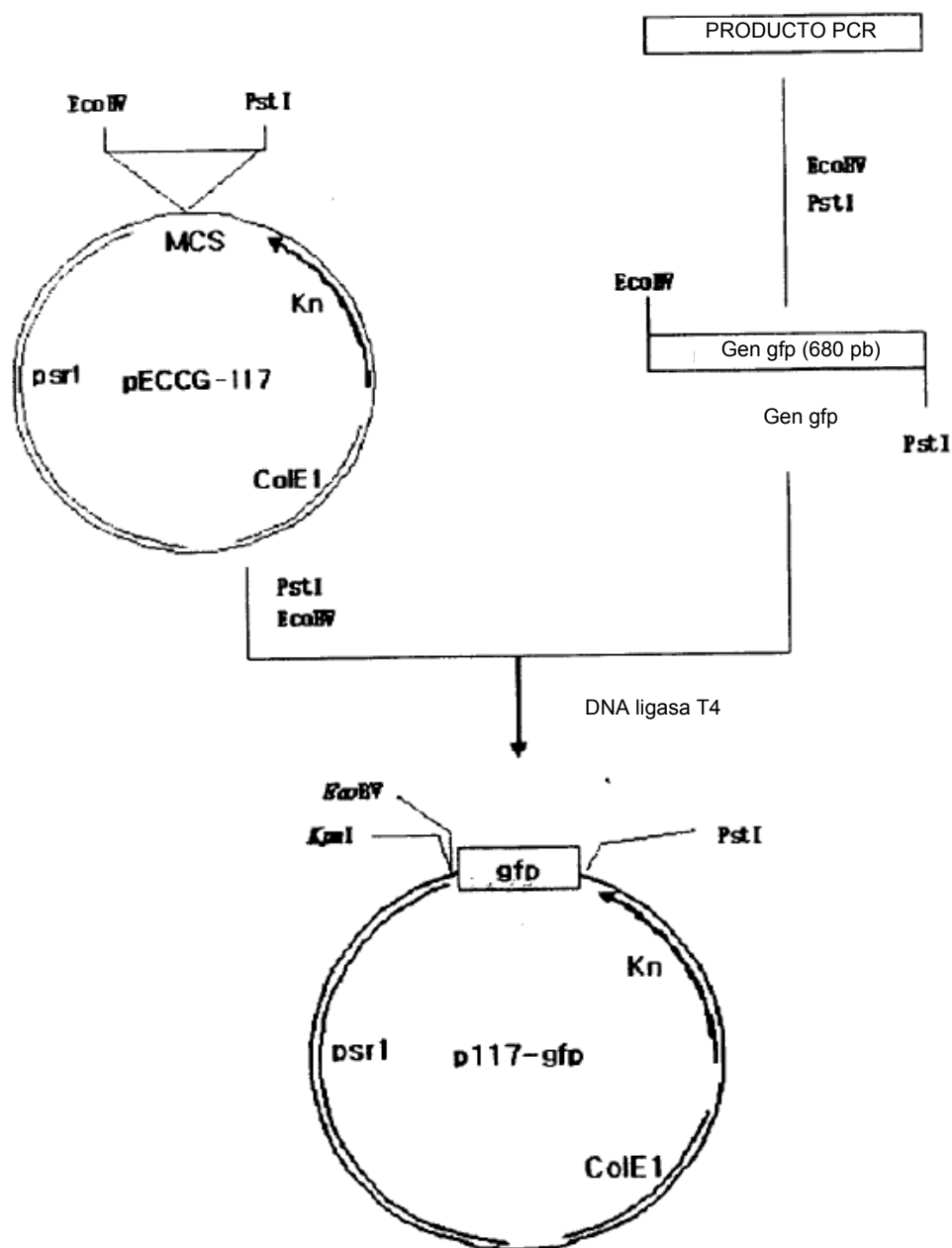


FIG. 3

