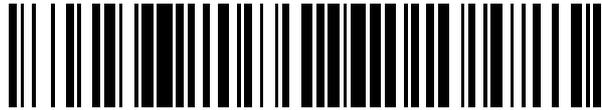


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 239**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09758416 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2298879**

54 Título: **Método para la amplificación de ADN en una célula**

30 Prioridad:

**05.06.2008 JP 2008147927**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.04.2015**

73 Titular/es:

**MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (100.0%)  
4-16, Kyobashi 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo , JP**

72 Inventor/es:

**MURAKAMI TAKESHI;  
SUMIDA NAOMI y  
YANAI KOJI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 534 239 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para la amplificación de ADN en una célula

**5 Referencia de solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente japonesa No. 2008-147927 presentada el 5 de junio, 2008.

**10 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para amplificar ADN útil para obtener un microorganismo que produce una sustancia objetivo en un alto rendimiento en un periodo de tiempo corto.

**15 Antecedentes de la invención**

Las cepas de alta producción usadas para la industria de la fermentación se obtienen por selección repetida y mejoras de reproducción durante varias décadas junto con procesos de mutación para obtener una buena cepa que tiene variaciones genéticas especiales. Por tanto, estos mutantes de alta producción son indudablemente el salvavidas de empresas y se consideran como los productos intensivos de técnicas muy importantes. Sin embargo, la mejora de las cepas por el proceso de mutación tiene defectos tales como que requiere mucho trabajo y tiempo, mala reproducibilidad, y baja probabilidad de obtener buenas cepas. Por tanto, la mejora de cepas recientemente ha avanzado cada vez más con la tecnología de manipulación génica como una tecnología teórica reproducible.

Los procesos para mejorar la productividad de una sustancia objetivo incluyen el aumento del número de copias por célula de un gen relacionado con la biosíntesis de la sustancia para aumentar su cantidad de expresión. La biosíntesis de metabolitos secundarios tal como antibióticos requiere muchos genes, que forman un complejo en un cromosoma que tiene una longitud que se extiende hasta varias decenas de kb. En este caso, el desarrollo de la tecnología para aumentar el número de copias de genes del complejo entero producirá muchos logros. Un proceso para aumentar el número de copias de genes relacionados con la biosíntesis de una sustancia objetivo incluye clonar en un plásmido que puede retener un alto número de copias, pero los plásmidos de tipo alta copia tienen un defecto de mantener la estabilidad, lo que hace difícil clonar ADN de una región larga. Además, los vectores cósmidos y vectores BAC que se han desarrollado para el fin de clonar el ADN de región larga están actualmente limitados en el número de copias para mejorar la estabilidad.

Se ha descrito en la patente en EE UU No. 5240858 que una cierta región génica se puede amplificar en tándem en el cromosoma en *Streptomyces achromogenes*. Sin embargo, esta tecnología se describe solo como una técnica que puede amplificar la región de ADN cuyo tamaño es 10 kb o menos y podría no ser aplicada a la amplificación en tándem de regiones génicas de tamaño gigante en un genoma.

Por otra parte, se ha descrito que un complejo génico biosintético de kanamicina se ha clonado por primera vez en 2002 (Publicación accesible al público de la patente japonesa No. 2004-173537). Se ha descrito además en el análisis génico de cepas de alta producción de kanamicina usadas en la industria de la fermentación que el número de copias del complejo génico biosintético de kanamicina se ha aumentado (Yanai, K. & Murakami, T., *Journal of Antibiotics*, (Japón), 2004, Vol. 57, p. 351-354). Se ha revelado entonces que la unidad de amplificación que contiene el complejo génico biosintético de kanamicina tiene un tamaño de 145 kb en una cepa de alta producción de kanamicina, y la unidad de amplificación se ha amplificado a 36 o más copias (Yanai, K. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666). Sin embargo, la cepa de alta producción que muestra estos fenómenos es la obtenida como resultado de procesos de mutación durante un periodo largo de tiempo y selecciones repetidas para mejorar la productividad de kanamicina (Yanai, K. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666). Por tanto, se ha creído imposible reproducir el fenómeno de amplificación en una región de ADN de tamaño gigante encontrada en una cepa de alta producción de kanamicina y encontrar un gen clave relacionado con ella.

Se ha descrito el uso de un complejo génico de los genes biosintéticos de la síntesis de kanamicina en vectores de expresión heterólogos (Laxmi Prasad Thapa et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 76, no. 6, 28 de Julio de 2007). Además, se han descrito vectores de expresión que comprenden genes de un complejo génico biosintético, por ejemplo, kanamicina (documento WO 2005/095591 A2).

En base a los antecedentes descritos anteriormente, todavía existe una necesidad para un proceso para amplificar en tándem una región de ADN de tamaño gigante en un genoma que pueda ser aplicable a un complejo génico requerido para la biosíntesis de metabolitos secundarios tal como antibióticos.

**65 Compendio de la invención**

Los inventores presentes han encontrado ahora que una región de ADN de un tamaño gigante se puede amplificar eficazmente en presencia de un polinucleótido que codifica una proteína específica en células. La presente invención se basa en tal información.

5 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para amplificar la región de ADN de un tamaño gigante eficazmente en células.

Según la presente invención se proporciona un proceso para amplificar ADN como se reivindica en la reivindicación 1 posteriormente.

10

La presente invención proporciona un proceso para amplificar ADN que comprende:

preparar una célula recombinante que comprende cualquiera de los polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los siguientes (A) a (E) y una unidad de ADN dispuesta en un genoma celular,

15

en donde la unidad de ADN tiene un tamaño de 22 a 154 kb y al menos comprende un primer fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (F) a (H), un gen diana y un segundo fragmento de ADN seleccionado de los siguientes (I) a (K),

20

el gen diana o el polinucleótido es exógeno a un huésped,

cultivar la célula recombinante en condiciones adecuadas para producir la amplificación génica para amplificar la unidad de ADN:

25

(A) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,  
(B) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene la delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que es funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

30

(C) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y que es funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

(D) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2,

(E) un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

35

(F) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,

(G) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en condiciones rigurosas,

40

(H) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,

(I) ADN representado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4,

(J) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 en condiciones rigurosas, y

45

(K) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

Según el proceso para amplificar ADN según la presente invención, la región de ADN de un tamaño gigante se puede amplificar eficazmente en células.

#### Breve descripción de las figuras

50

La figura 1 representa un fragmento del inserto del cósmido AB501.

La figura 2 representa un fragmento del inserto del cósmido pAB801.

#### 55 Descripción de formas de realización

##### Depósito

60

El cósmido AB501 (Escherichia coli JM109/cósmido AB501) según la presente invención se ha depositado en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, No. 6, Chuo, 1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaragi, Japón, código postal: 305-8566 con el número de depósito de FERM BP-11114 en la fecha de depósito original del 14 de mayo, Heisei 20 (2008).

65

Además, el cósmido pAB801 (Escherichia coli JM109/pAB801) según la presente invención se ha depositado en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, No. 6,

Chuo, 1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaragi, Japón, código postal: 305-8566 con el número de depósito de FERM BP-11121 en la fecha de depósito original del 28 de abril, Heisei 21 (2009).

### Definición

5 El término proteínas o polinucleótidos “funcionalmente equivalentes” como se usa en el presente documento significa lo siguiente.

10 En proteínas o polinucleótidos, la variación estructural en sus secuencias puede estar causada por polimorfismo genético o mutación, reacción de modificación, y similares. Sin embargo, se sabe que algunas proteínas o polinucleótidos, aunque tienen estas variaciones, tienen sustancialmente actividades fisiológicas y biológicas sustancialmente equivalentes respecto a proteínas y polinucleótidos que no tienen tales variaciones. Por tanto, tales proteínas o polinucleótidos, en los que no se observa gran diferencia a pesar de sus diferencias estructurales respecto a los que no tienen variaciones, se denominan las proteínas o polinucleótidos “funcionalmente equivalentes”.

15 La terminología “secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos se han deletado, sustituido, insertado o añadido” usada en el presente documento significa que se han hecho alteraciones por técnicas bien conocidas incluyendo mutagénesis específica de sitio o mediante la sustitución de una pluralidad de aminoácidos que es probable que se produzca en la naturaleza.

20 Además, el término “identidad” con respecto a secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos se usa como el significado de que los residuos de nucleótidos o aminoácidos que constituyen las respectivas secuencias concuerdan entre sí entre las secuencias que se van a comparar. Los valores de “identidad” descritos en el presente documento pueden ser los calculados con un programa de recuperación de identidad que conoce bien el experto en la materia, y se puede calcular fácilmente usando un parámetro por defecto de BLAST y similares.

25 El término “condición rigurosa” usado en el presente documento significa que la operación de lavado de una membrana después de la hibridación se realiza en una solución a baja concentración de sal a una temperatura alta, por ejemplo, en la condición de lavado de concentración de SSC 2 x (SSC 1X: citrato trisódico 15 mM, cloruro de sodio 150 mM) en una solución de SDS al 0,5% a 60°C durante 20 minutos. Además, la hibridación se puede realizar según un método bien conocido y por tanto se puede realizar según la instrucción acompañante de una genoteca comercialmente disponible.

30 El término “región RsA” usado en el presente documento significa la secuencia de 94693 a 94726 en la secuencia de nucleótidos registrada como número de acceso AB254080 (número total de nucleótidos 205447 pb) en la base de datos de Genbank. Además, el término “región RsB” significa la secuencia de 6177 a 6210 en la secuencia de nucleótidos registrada como número de acceso AB254081 (número total de nucleótidos 15046 pb) en la base de datos de Genbank.

### 40 **Polinucleótido/proteína de la invención**

45 El proceso para amplificar ADN de la presente invención comprende amplificar ADN como la diana de amplificación en células (también denominado de aquí en adelante como “gen diana”) en presencia de un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una proteína funcionalmente equivalente a la misma (denominado de aquí en adelante como “polinucleótido de la invención”).

50 Es un hecho inesperado que el ADN en un tamaño gigante se pueda amplificar eficazmente en células en presencia del polinucleótido de la invención. El polinucleótido de la invención puede estar presente en un genoma celular o en una matriz de células siempre que no inhiba la amplificación del ADN en el gen diana. Además, según una forma de realización, el polinucleótido de la invención está presente en el genoma celular.

Además, el polinucleótido de la invención puede ser ADN o ARN, pero preferiblemente ADN.

55 Según una forma de realización de la presente invención, el polinucleótido descrito anteriormente es un ADN seleccionado de los siguientes (i), (ii) y (iii) (denominado de aquí en adelante como el ADN de la invención):

(i) ADN que codifica una proteína seleccionada de las siguientes 1), 2) y 3):

- 60
- 1) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
  - 2) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una deleción, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y
  - 3) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- 65 (ii) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2,

- (iii) ADN que codifica una proteína que hibrida con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas y tiene la función de amplificar ADN.

5 El ADN de la invención es preferiblemente un ADN que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y más preferiblemente un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. Además, según una forma de realización, el ADN de la invención también contiene un ADN contenido en el cósmido AB501 depositado con el número de acceso FERM BP-11114.

10 Además, según otra forma de realización preferida, el polinucleótido de la invención incluye los siguientes polinucleótidos:

- (A) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,  
 (B) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que es funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,  
 (C) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y que es funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,  
 (D) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, y  
 (E) un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

25 Además, la proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una proteína funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (denominada de aquí en adelante como "la proteína de la invención") tiene una excelente actividad para amplificar ADN y se puede usar ventajosamente para la amplificación de ADN en el genoma celular.

30 La proteína de la invención también se puede añadir, por ejemplo, como una composición junto con un tampón deseado y similar a células que se van a cultivar para amplificar la región de ADN en un genoma celular.

Por tanto, según otra forma de realización de la presente invención se proporciona una composición para amplificar ADN, que comprende una proteína seleccionada de las siguientes 1) a 3):

- 35 1) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,  
 2) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y  
 40 3) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En la proteína de la invención la terminología "uno o más aminoácidos" significa aminoácidos preferiblemente en el intervalo de 1 a 50, más preferiblemente de 1 a 30, más preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5, y más preferiblemente de 1 a 2.

45 Además, en la proteína de la invención, la terminología "una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más" significa una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de preferiblemente el 95% o más, más preferiblemente el 98% o más, y más preferiblemente el 99% o más.

50 Además, las proteínas de 2) y 3) son preferiblemente las que son funcionalmente equivalentes a la proteína de 1). Con respecto a esto, la identidad funcional de las proteínas 2) y 3) respecto a la proteína 1) se puede confirmar, por ejemplo, comparando los casos de aplicar estas proteínas o sus polinucleótidos a una cepa de Streptomyces con uso del nivel de amplificación de ADN entre la región RsA y la región RsB en la cepa como un índice. Tal experimento de comparación lo puede llevar a cabo fácilmente el experto en la materia, por ejemplo, mediante referencia a los ejemplos 8 a 10.

#### Región de ADN/unidad de ADN como la diana de amplificación

60 Además, en el proceso para amplificar ADN de la presente invención, la región de ADN que se va a amplificar es preferiblemente la región de ADN entre la región RsA y la región RsB.

La región RsA y la región RsB son regiones de ADN que contienen un complejo génico biosintético de kanamicina que está presente en el ADN cromosómico de Streptomyces kanamyceticus. La región RsA y la región RsB se han descrito en detalle por Yanai, K. et al., "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666 que se incorpora al presente documento mediante referencia.

La región de ADN entre la región RsA y la región RsB se puede amplificar eficazmente como una unidad de ADN en presencia del polinucleótido de la invención. La unidad de ADN entre la región RsA y la región RsB está preferiblemente en el intervalo de 22 a 154 kb. Según la presente invención, las unidades de ADN en tal tamaño gigante también se pueden amplificar ventajosamente.

Además, la región RsA es un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y la región RsB es un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4. Por tanto, según una forma de realización, el proceso para amplificar ADN según la presente invención se lleva a cabo en presencia del siguiente ADN de (a) y (b):

- (a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y
- (b) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

El ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en (a) puede solo contener la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y uno o más nucleótidos pueden estar deletados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 siempre que el proceso para amplificar ADN según la presente invención se produzca en la base de la recombinación específica en el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 y el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4. El ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 preferiblemente incluye el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3.

Además, el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 en (b) puede solo contener la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, y uno o más nucleótidos pueden estar deletados de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 siempre que el proceso para amplificar ADN según la presente invención se produzca en la base de la recombinación específica en el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 y el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4. El ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 preferiblemente incluye el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

Además, en el proceso para amplificar ADN según la presente invención, el ADN como la diana de amplificación puede ser la unidad de ADN insertada entre los ADN que son funcionalmente equivalentes a la región RsA y la región RsB. A este respecto, el término los ADN que son funcionalmente equivalentes a la región RsA y la región RsB significa los que se amplifican equivalentemente a la región RsA y la región RsB en el genoma celular en presencia del polinucleótido de la invención. La identidad funcional la puede confirmar fácilmente un experto en la materia, por ejemplo, mediante referencia a los ejemplos 8 a 10.

Además, según la forma de realización preferida de la presente invención, la unidad de ADN comprende un primer fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (F) a (H) y un segundo fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (I) a (K):

- (F) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,
- (G) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en condiciones rigurosas,
- (H) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,
- (I) ADN representado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4,
- (J) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 en condiciones rigurosas, y
- (K) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

Además, en (H) y (K) descritos anteriormente, el término "ADN que tiene una identidad del 90% o más" significa ADN que tiene una identidad de preferiblemente el 95% o más, más preferiblemente el 98% o más, más preferiblemente el 99% o más.

Además, el gen diana que codifica la sustancia objetivo preferiblemente se dispone en una unidad de ADN que tiene la región RsA y la región RsB o ADN funcionalmente equivalentes a los mismos. Por tanto, según una forma de realización de la presente invención, el gen diana está presente entre los ADN (a) y (b). Además, según otra forma de realización de la presente invención, la unidad de ADN comprende el primer fragmento de ADN, el gen diana, y el segundo fragmento de ADN en este orden desde el extremo 5'.

Además, la unidad de ADN preferiblemente se dispone en un genoma celular. Además, según una forma de realización, tanto la unidad de ADN como el polipéptido de la presente invención están dispuestos en el genoma celular. En este caso, la disposición y la distancia entre el polinucleótido de la presente invención y la unidad de ADN en el genoma celular las determina apropiadamente el experto en la materia en consideración al nivel de expresión del gen diana.

Gen diana/sustancia objetivo

El gen diana de la presente invención puede ser, pero no está específicamente limitado siempre que se pueda introducir en la unidad de ADN, un único gen o un grupo de genes requerido para la biosíntesis de una sustancia objetivo.

5 Además, la sustancia objetivo codificada por el gen diana no está específicamente limitada siempre que sea una sustancia cuya productividad se puede mejorar aumentando el número de copias del gen diana, pero las sustancias objetivo preferidas incluyen antibióticos medica y/o agrícolamente útiles tal como antibióticos aminoglucósidos, sustancias fisiológicamente activas, enzimas y similares.

10 Además, es preferible insertar un gen marcador de selección que incluye un gen de resistencia a un fármaco en el ADN en consideración a seleccionar las células con ADN amplificado. El gen de resistencia a fármaco no está limitado específicamente siempre que pueda producir expresión génica en un organismo que tiene amplificación de ADN producida en el mismo y el producto génico funcione, pero es preferiblemente un gen de resistencia a kanamicina.

15 Transferencia del gen diana o polipéptido de la invención en un huésped/vector

Además, el gen diana o polipéptido de la invención puede ser endógeno o exógeno a un huésped, pero al menos uno del gen diana o el polipéptido es preferiblemente exógeno a un huésped.

20 El gen diana o polipéptido de la invención se introduce adecuadamente en una célula huésped con un vector.

En el caso de introducir el polinucleótido de la invención en un huésped, se usa preferiblemente un vector para amplificación de ADN que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en de (A) a (C) en la forma funcional:

- (A) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- (B) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene la delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que tiene actividad de amplificación de ADN, y
- (C) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y que tiene actividad de amplificación de ADN.

35 El vector comprende el polinucleótido de la invención en una forma funcional y por tanto puede expresar la proteína de la invención en células. A este respecto, la terminología "comprende en la forma estructural" significa que el polinucleótido de la invención se inserta en el vector de tal manera que la proteína de la invención se puede expresar bajo el control de elementos requeridos para una expresión adecuada descritos posteriormente.

40 Además, el gen diana preferiblemente se dispone, como se ha descrito anteriormente, en una unidad de ADN insertada entre la región RsA y la región RsB o entre los ADN funcionalmente equivalentes a los mismos en presencia del polipéptido de la invención. Por tanto, cuando el gen diana se introduce en un huésped, preferiblemente se usa un vector para amplificar ADN, que comprende una unidad de ADN que comprende un primer fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en (F) a (H), un gen diana, y un segundo fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en (I) a (K), y capaz de introducir la unidad de ADN en un genoma celular.

Además, el gen diana y el polinucleótido de la invención preferiblemente se introducen junto con elementos requeridos para la expresión tal como una secuencia promotora y una secuencia señal de terminación de la transcripción en una célula huésped. El promotor y la señal de terminación de la transcripción se pueden determinar apropiadamente dependiendo de la especie del organismo de un huésped para fomentar la expresión génica de alta eficacia. Además, el promotor y la señal de terminación de la transcripción pueden ser el promotor y la señal de terminación de la transcripción originales de un gen que contiene el gen diana y el polinucleótido de la invención.

55 Los otros elementos requeridos para la expresión además de la secuencia promotora y la secuencia señal de terminación de la transcripción incluyen, por ejemplo, un potenciador para expresar eficazmente un gen objetivo y una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma). Los elementos requeridos para la expresión se pueden disponer en un sitio adecuado de un vector dependiendo de sus propiedades. Además, los elementos requeridos para la expresión se pueden seleccionar en consideración a la combinación con un huésped y la productividad de la sustancia objetivo.

Además, en el caso de introducir el polinucleótido de la invención o la unidad de ADN en el genoma del huésped por recombinación homóloga, se dispone en el vector una secuencia homóloga de ADN que tenga la identidad capaz de recombinación homóloga con una parte del genoma del huésped. La secuencia homóloga de ADN contenida en el vector puede ser individual o plural siempre que la recombinación eficaz y expresión del polipéptido de la presente invención o el gen diana no se prevengan, pero es preferiblemente dos. Además, estas dos secuencias homólogas

de ADN preferiblemente se disponen en el extremo 5' y el extremo 3' de la unidad de ADN que se va a introducir. Por tanto, según una forma de realización de la presente invención, el vector comprende al menos la secuencia homóloga de ADN dispuesta en el extremo 5', la unidad de expresión del gen de la proteína objetivo y la secuencia homóloga de ADN dispuesta en el extremo 3'.

Además, la secuencia homóloga de ADN tiene la identidad y longitud capaces de recombinación homóloga con el genoma del huésped. En consideración a la disponibilidad y probabilidad de la reacción de recombinación homóloga, la identidad de la secuencia homóloga de ADN y el genoma del huésped es preferiblemente satisfactoriamente alta, y ambas son preferiblemente la misma secuencia. Además, las longitudes de los dos fragmentos homólogos de ADN las selecciona apropiadamente el experto en la materia respectivamente en consideración al sitio en que se va a introducir, la eficacia de introducción, y similares.

Los vectores usados en la presente invención no están limitados específicamente, siempre que estos vectores sean capaces de introducir el gen diana o el polinucleótido de la invención en el genoma celular, e incluyen, por ejemplo, un vector plásmido, un vector cósmido, un vector fago y un vector BAC, preferiblemente un vector cósmido.

Los vectores descritos anteriormente se pueden construir con uso de métodos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el método descrito por Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989).

#### Método para introducir un vector en células

Se pueden usar los métodos bien conocidos en la técnica para la introducción de los vectores en células e incluyen, por ejemplo, un método de electroporación, un método de microinyección, un método de fosfato de calcio, un método de lipofección y un método de transferencia conjugativa. Estos métodos de transferencia los selecciona apropiadamente un experto en la materia en consideración a las células huésped, tamaños de vectores, eficacias de transferencia, y similares.

#### Cultivo/selección de células

En el método para amplificar ADN de la invención, las células en las que se han introducido el gen diana y el polinucleótido de la invención se cultivan para amplificar una unidad de ADN en condiciones de producir amplificación génica.

Cuando las células tienen el gen marcador de selección descrito anteriormente, se pueden obtener células que tiene una unidad de ADN amplificada cultivando las células una condición de cultivo de selección apropiada. Por ejemplo, cuando se usa una cepa que contiene tanto genes biosintéticos de kanamicina como un gen de resistencia a kanamicina como huésped, se puede seleccionar una cepa que tiene una unidad de ADN amplificada subcultivando la cepa en un medio que contiene kanamicina durante aproximadamente tres pases y aumentando en serie la cantidad de kanamicina añadida durante estos pases.

Además, en la selección de una célula recombinante, se puede seleccionar precisamente la célula recombinante que contiene las copias plurales de una unidad de ADN usando secuenciación de ADN genómico, transferencia de Southern, y similares.

#### Célula recombinante/microorganismo recombinante

Además, la célula recombinante de la invención se produce por la técnica descrita anteriormente y comprende las copias plurales de la unidad de ADN como la diana de amplificación introducida en el genoma. Por tanto, el microorganismo obtenido por el proceso de la presente invención comprende una región de ADN de amplificación en la que se han introducido las copias plurales. Tales células y microorganismos recombinantes se pueden usar para producir eficazmente la sustancia objetivo.

Además, en las células descritas anteriormente, la unidad de ADN es preferiblemente exógena al huésped. Además, el número de copias de la unidad de ADN es 2 o más. Además, según la forma de realización más preferida de la presente invención, el gen diana en la célula recombinante se incorpora en el genoma como la unidad de ADN que contiene al menos una secuencia promotora y una secuencia señal de terminación de la transcripción. El gen diana o la unidad de ADN en la célula recombinante descrita anteriormente también se puede incorporar reiterativamente, preferiblemente en tándem.

#### Huéspedes

A continuación, el huésped no está específicamente limitado siempre que no prevenga la práctica de la amplificación del ADN de la invención, pero es preferiblemente un microorganismo, más preferiblemente una cepa productora de antibióticos, y similares. Más específicamente, el huésped es preferiblemente Actinomycetes, más preferiblemente

una cepa derivada de Streptomyces, más preferiblemente, Streptomyces kanamyceticus, Streptomyces coelicolor o Streptomyces lividans, más preferiblemente Streptomyces kanamyceticus.

#### Producción de sustancias objetivo

En la presente invención, se puede producir una sustancia objetivo cultivando una célula recombinante que contiene copias plurales del gen diana obtenida por el método descrito anteriormente en un medio. Las condiciones detalladas de cultivo de la célula recombinante las determina adecuadamente dependiendo de la propiedad y estado de la célula el experto en la materia.

La sustancia objetivo también se puede aislar por técnicas bien conocidas tales como centrifugación, filtración en gel y filtración a través de un filtro.

#### **Ejemplos**

La presente invención se describe ahora específicamente con referencia a ejemplos, pero no se limita a los mismos.

#### Ejemplo 1: Amplificación de los genes biosintéticos de kanamicina de la cepa Streptomyces kanamyceticus JCM 4775

##### 1) Subcultivo y mejora de la productividad de kanamicina de Streptomyces kanamyceticus

Se inoculó la célula liofilizada (tubo L) de la cepa JCM4775 (RIKEN BioResource Center) en un medio de siembra (licor de maceración de maíz al 3%, levadura seca al 0,25%, CaCl<sub>2</sub> al 0,1%, estaminol (comercializado por Nippon Nogyo Shizai Kabushiki Kaisha, fabricado por Sapporo Breweries Ltd.) al 0,1%, pH 7,5 antes de la esterilización, se cargó un volumen de 40 ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml). El medio se incubó en un agitador rotatorio a 220 rpm y 28°C durante 48 horas para dar una cepa A (primera generación). A continuación, se inoculó una porción de 1 ml del cultivo en dos medios de siembra sin antibiótico y con 250 µg/ml de kanamicina, respectivamente. Estos cultivos se incubaron en un agitador rotatorio a 220 rpm y 28°C durante 48 horas para dar una cepa B que no contenía antibiótico y una cepa C que contenía 250 µg/ml de kanamicina (segundas generaciones). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo B se inoculó después en el medio de siembra que no contenía kanamicina y se incubó en un agitador rotatorio a 220 rpm y 28°C durante 48 horas para dar una cepa D (tercera generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo C se inoculó después en medio de siembra que contenía 500 µg/ml y 2000 µg/ml, respectivamente, de kanamicina y se incubó en un agitador rotatorio a 220 rpm y 28°C durante 48 horas para dar una cepa E que contenía 500 µg/ml de kanamicina y una cepa F que contenía 2000 µg/ml de kanamicina (terceras generaciones), respectivamente.

Para conservar las cepas obtenidas anteriormente, los líquidos de cultivo de la primera generación (A), la segunda generación (B, C), y la tercera generación (D, E, F), respectivamente, se mezclaron con el mismo volumen de leche desnatada al 20% al completar la incubación durante 48 horas y se crioservaron a -80°C. Una porción de 0,5 ml de cada cepa A, B, C, D, E y F se inoculó en un medio de siembra que no contenía antibiótico y se incubó durante 48 horas. Después de completar la incubación, una porción de 50 µl de cada líquido de cultivo incubado se extendió en un medio agar para la producción (almidón al 1%, glucosa al 0,25%, harina de soja al 0,6%, peptona al 0,15%, KCl al 0,0025%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,025%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,05%, NaCl al 0,15%, CaCO<sub>3</sub> al 0,15%, pH 7,0 antes de la esterilización, 20 ml/placa) y se incubó a 28°C durante 7 días. El medio agar en el que se había crecido Streptomyces kanamyceticus JCM4775 se perforó con un perforador (diámetro de 5 mm), y el trozo de disco se colocó en una placa de agar que contenía B. subtilis ATCC6633 y se cultivó a 37°C durante 18 horas para formar una zona inhibitoria por kanamicina. Como estándar para examinar las cantidades de producción, se prepararon medios de agar para la producción a los que se habían añadido 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml, respectivamente, de kanamicina, y se perforaron con un perforador (diámetro de 5 mm) de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Como resultado de comparar las zonas inhibitorias formadas por estos discos con la zona inhibitoria obtenida anteriormente, las concentraciones de kanamicina producidas en el medio de agar para producción fueron A; 10 µg/ml, B; 10 µg/ml, C; 150 µg/ml, D 10 µg/ml, E; 200 µg/ml, y F; 250 µg/ml, respectivamente. Por tanto, la capacidad productora de kanamicina de la primera generación (A) aumento de 20 a 25 veces en las terceras generaciones (E, F).

##### 2) Evidencia de amplificación génica: detección de sitio de unión de recombinación (RsB/RsA) por PCR

Después de completar la incubación de la primera generación, segunda generación y tercera generación, respectivamente, durante 48 horas, una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo se sometió a centrifugación a 7500 rpm durante 10 minutos. Después de decantar el sobrenadante obtenido de esta manera, las células se liofilizaron al vacío. Se usó la porción de 1/10 de las células secas para aislar ADN cromosómico en el siguiente método. Es decir, la cantidad de 1/10 de las células secas se diluyó con 1 ml de un tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8) y 50 µl de una solución de lisozima (concentración: 20 mg/ml). Después de la lisis a 37°C durante 30 minutos, se añadieron 2 ml de una solución de adsorción de lisis acompañada con un kit de purificación de ADN genómico, MagExtractor™-Genome- (TOYOBO) a la solución de lisis. Después de agitar, se transfirió 1 ml de la

mezcla a un tubo Eppendorf y se sometió a centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos. Una porción de 850 µl del sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf sin tapa, y el ADN se separó con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) según las instrucciones que acompañan al kit. A continuación, se realizó una prueba de amplificación por el método de PCR con el ADN cromosómico de cada cepa de A, B, C, D, E y F obtenidas en 1). Los cebadores sintéticos usados son KM-16' (5'-CCGGCACTTCGCTCCAA-3', SEQ ID NO: 5) y KM-17' (5'-GCGGGTTCGCCAACTCCA-3', SEQ ID NO: 6). La reacción de PCR se llevó a cabo con TaKaRa LA TaqR con tampón GC (Takara Bio Inc.) mediante la modificación parcial del protocolo acompañante. Es decir, la solución de reacción comprende 0,5 µl de TaKaRa LA Taq™ (5 unidades/µl), 25 µl de tampón GC II 2 x, 8 µl de solución de dNTP (cada uno 2,5 mM), 2,5 µl de dimetilsulfóxido, 100 pmol (1 µl) de ADN cromosómico, 100 pmol (1 µl) de cebador KM-16', 100 pmol (1 µl) de cebador KM-17', y agua esterilizada (11 µl), y el volumen final se ajustó a 50 µl. La hibridación se llevó a cabo a una temperatura de 50°C, la amplificación se realizó durante 25 ciclos, y la extensión se realizó a 72°C durante 2 minutos. Cuando se produce la recombinación del ADN en la región RsA (5'-GAAGTGACGATACCTTGGTCCTCTCAAATCAAGA-3', SEQ ID NO: 3) y la región RsB (5'-ACCACGACGACACCCTGGTCCGCGGAGGAGGT-3', SEQ ID NO: 4), produce la amplificación de un fragmento de ADN de 1,2 kb (Yanai, K. et al., "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666). Como resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la solución de reacción, no se detectaron fragmentos de ADN que se van a amplificar usando el ADN cromosómico de las cepas A, B y D, respectivamente, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,2 kb usando el ADN cromosómico de las cepas C, E y F, respectivamente. La banda de amplificación de C mostró una potencia de aproximadamente la mitad de tinción de bromuro de etidio comparada con E y F. Se ha revelado de este resultado que la región de ADN entre la región RsA y la región RsB se ha amplificado por subcultivo con la adición de kanamicina.

### 3) Evidencia de amplificación génica: detección de la región de ADN amplificada por análisis de transferencia Southern

El ADN cromosómico (5 µg) de A, B, C, D, E y F, respectivamente, se cortó con BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El ADN en el gel de agarosa se transfirió a Hybond™-N+ (GE Healthcare Bioscience). La hibridación se realizó con el sistema de marcaje y detección directa de ácido nucleicos ECL™ (GE Healthcare Bioscience) según las instrucciones acompañantes. Como sonda se usó un fragmento SphI de 4,95 kb derivado de pKM92 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666).

Mientras que se detectó un fragmento BamHI de 9,6 kb en las cepas silvestres, un fragmento BamHI de 10,8 kb se detectó además tras la recombinación de ADN en la región RsA y la región RsB (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666). Como resultado de la hibridación, se detectó una banda de 9,6 kb en todas las muestras. También se detectó una banda de 10,8 kb en la muestra de F, y las bandas de 9,6 kb y 10,8 kb tenían una densidad casi igual. Mientras que la banda de 10,8 kb se detectó también en la muestra de E, tenía una densidad muy débil. Se ha revelado de la detección del fragmento BamHI de 10,8 kb en las muestras de E y F que la recombinación de ADN ha ocurrido entre las regiones de RsA y RsB en las cepas E y F y una región de ADN entre estas regiones se ha amplificado.

### Ejemplo 2: Preparación del cósmido 203-7 que tiene la región RsA químicamente sintetizada y transferencia en una cepa de tipo salvaje

Para examinar la presencia de un gen clave que produce la amplificación del ADN en una región de ADN de 106,6 kb entre las regiones RsC y RsD (secuencia de nucleótidos 28935-135581) entre la secuencia de nucleótidos del complejo génico biosintético de kanamicina derivado de Streptomyces kanamyceticus que se ha registrado como el número de acceso AB254080 (número total de nucleótidos 205447 pb) en la base de datos de Genbank, se preparó una cepa que tiene la región RsA (secuencia de nucleótidos 94693-94726, SEQ ID NO: 3) pero en la que se ha delecionado casi de la región de ADN entre las regiones RsC-RsD en el siguiente método y se examinó la capacidad de amplificación del ADN.

#### 1) Preparación del cósmido AB201

Se preparó el cósmido AB201 que tiene un gen de resistencia a apramicina y un sitio nuevo de enzima de restricción EcoRV insertado en el extremo derecho del fragmento de inserción del cósmido 4-5 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) en el siguiente método.

El plásmido pIJ773 (Gust, B. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2003, Vol. 100, p. 1541-1546) se digirió doblemente con HindIII y EcoRI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para dar un fragmento de ADN de aprox. 1,3 kb que contenía el gen de resistencia a apramicina como el objeto, que se usó como molde para la amplificación de un fragmento de ADN de aprox. 1,4 kb por el método de PCR con dos cebadores sintéticos (RsA1U y RsA1L) representados por las siguientes secuencias de nucleótidos.

RsA1U:

5'-CACGGCACGGAATACCACTGCGTGCCCGTCGACGACGGTATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' (SEQ ID NO: 7)

RsA1L:

5'-CCAGGTCGGGAAGGGTGCTCTCCGCGCGAGCGGAGGTGATATCTTGATTTGAGAGGACCAAGGTATCGTCA  
CTTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' (SEQ ID NO: 8)

La reacción de PCR se realizó con TaKaRa LA Taq™ con tampón GC (Takara Bio Inc.) en la condición descrita en el ejemplo 1-2). El fragmento de ADN de aprox. 1,4 kb que contenía el gen de resistencia a apramicina derivado de pIJ773 se purificó de la cantidad total del líquido de reacción con un kit de purificación de PCR QIAquickR (QIAGEN) según el protocolo acompañante.

El cósmido 4-5 se transfirió después a *E. coli* BW25113/pIJ790 (Gust, B, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (USA), 2003, Vol. 100, p. 1541-1546) para dar una cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido 4-5. Esta cepa se inoculó en 100 ml de un medio líquido LB (bactotripton a al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5%) que contenía cloranfenicol, kanamicina y ampicilina en una concentración de 25 µg/ml, 25 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente, y se incubó a 30°C durante la noche. En un tubo de ensayo con un volumen de 65 ml se cargaron 10 ml de un medio SOB (bactotripton a al 2%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,05%, cloruro de potasio al 0,0186%), y se añadieron cloranfenicol, kanamicina, ampicilina y L-arabinosa en una concentración de 25 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 10 mM, respectivamente. Al medio se inocularon 100 µl del líquido de cultivo de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido 4-5 que se había incubado durante la noche, y la mezcla se incubó con agitación a 30°C durante 4 horas. La cantidad total del líquido de cultivo se centrifugó a 4°C y 3000 rpm durante 5 minutos para recoger células, que después se resuspendieron en 10 ml de una solución de glicerol al 10% helada. Después de repetir el procedimiento, la suspensión se resuspendió otra vez en 100 µl de la solución de glicerol al 10% fría. A continuación, a 50 µl de la solución celular en un tubo Eppendorf se añadieron 5 µl de una solución de fragmento de ADN de aprox. 1,4 kb que contenía el gen de resistencia de apramicina derivado de pIJ773, y la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación de 2 mm de hueco previamente enfriada (BM Equipment Co. Ltd.: BM6200). La electroporación se llevó a cabo con Electro Cell Manipulator 600 (BM Equipment Co. Ltd.) en la condición de 12,5 kV, 25 µF y 128 Ω. A las células tratadas se añadió 1 ml de un medio líquido LB previamente enfriado, y la mezcla se cultivó estáticamente a 37°C durante 1 hora. El cultivo se extendió en un medio LB agar al que se habían añadido 50 µg/ml de ampicilina y apramicina, respectivamente, y se cultivó a 37°C durante la noche para dar una cepa que mostró resistencia tanto a ampicilina como a apramicina. Esta cepa se inoculó en un medio líquido LB al que se habían añadido 50 µg/ml de ampicilina y apramicina, respectivamente, para aislar el cósmido AB201.

## 2) Preparación del cósmido AB202

Se preparó el cósmido AB202 que tiene un gen de resistencia a estreptomycin y un sitio nuevo de enzima de restricción Bsp1407I insertado en el extremo izquierdo del fragmento de inserción del cósmido 5-13 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) en el siguiente método.

El plásmido pIJ778 (Gust, B, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (USA), 2003, Vol. 100, p. 1541-1546) primero se digirió doblemente con HindIII y EcoRI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para dar un fragmento de ADN de aprox. 1,8 kb que contenía el gen de resistencia a estreptomycin como el objeto, que se usó como molde para la amplificación de un fragmento de ADN de aprox. 1,9 kb por el método de PCR con dos cebadores sintéticos (RsA2U y RsA2L) representados por las siguientes secuencias de nucleótidos.

RsA2U:

5'-CTCGCGCGGGAGCACCCCAGGCTGCCTGCAGAAACTGTACATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' (SEQ ID NO: 9)

RsA2L:

5'-AGTTCGCATCGCCCATCTAAGGAACTGGTGGCCTTAGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' (SEQ ID NO: 10)

Se purificó un fragmento de ADN de aprox. 1,9 kb que contenía un gen de resistencia a estreptomycin derivado a pIJ778 de la cantidad total del líquido de reacción con un kit de purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN). Este fragmento se transfirió a *E. coli* 25113/pIJ792/cósmido 5-13 por el método de electroporación para dar una cepa que mostró resistencia tanto a ampicilina como estreptomycin. Esta cepa se incubó en un medio líquido LB al que se habían añadido 50 µg/ml de ampicilina y estreptomycin, respectivamente, para aislar el cósmido AB202.

## 3) Preparación del cósmido 203-7

Se preparó el cósmido 203-7 insertando un fragmento Bsp1407I-EcoRV de aprox. 16 kb del cósmido AB201 que contenía un gen de resistencia a apramicina en el sitio Bsp1407I-EcoRV del cósmido AB202.

Primero, el cósmido AB201 se dirigió triplemente con Bsp14071, EcoRV y SphI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un fragmento Bsp14071-EcoRV de aprox. 16 kb del gel de agarosa con un kit de extracción de gel QIAquick™ (QIAGEN). A continuación, el cósmido AB202 se dirigió doblemente con Bsp14071 y EcoRV, se extrajo del gel de agarosa de la misma manera, y se mezcló con el fragmento de vector purificado derivado del cósmido AB201 para la reacción de ligación.

La solución de ADN ligado se sometió a empaquetamiento in vitro con extractos de empaquetamiento de lambda MaxPlax™ (EPICENTRE™ Biotechnologies), se transmitió a una cepa E. coli XL1-BlueMRA y se extendió en un medio agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y apramicina (20 µg/ml). Las colonias producidas de esta manera se incubaron en un medio líquido LB al que se habían añadido 50 µg/ml de ampicilina y apramicina, respectivamente, para aislar el cósmido 203-7. Como resultado de analizar las secuencias de nucleótidos en ambos extremos del fragmento de inserción del cósmido 203-7, se ha revelado que el fragmento Bsp14071 (secuencia de nucleótidos 123007-123183, 177 pb) derivado del cósmido 5-3 también se ha insertado simultáneamente con la inserción de un fragmento BstAUI-EcoRV derivado del cósmido 4-5. Por tanto, el cósmido 203-7 es un cósmido que tiene una deleción de la secuencia de nucleótidos 33306-128995 entre la región de ADN entre RsC-RsD (secuencia de nucleótidos 28935-135581) pero contiene 34 pb (secuencia de 94693-94726) y el fragmento Bsp14071 (177 pb) como la región RsA.

#### 4) Transferencia del cósmido 203-7 en Streptomyces kanamyceticus

El cósmido 203-7 se transfirió a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwick, 2000) según el método normal para dar E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 203-7.

Se conjugó Streptomyces kanamyceticus JCM4775 con E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 203-7 como se describe a continuación. Primero, una cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775 se incubó en un medio de siembra a 28°C durante 48 horas, y 100 µl del líquido de cultivo se extendieron en un medio agar R2 modificado (sacarosa 10,3 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,01 g, glucosa 1 g, casaminoácidos de Difco 0,01 g, agar 2,2 g, extracto de levadura al 10% esterilizado por separado 5 ml en 95 ml de agua). Después de cultivar a 28°C durante 7 días, se añadieron 3 ml de una solución de glicerol al 20% y se recogieron micelios en medio agar por raspado. Después de recoger las células por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, las células se resuspendieron en 3 ml de una solución de glicerol al 20%. Por otra parte, después que se incubara la cepa E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 203-7 en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y apramicina, respectivamente, a 37°C durante 18 horas, 1 ml de líquido de cultivo se trasplantó en 100 ml de un medio líquido LB (50 µg/ml de ampicilina y apramicina, respectivamente) para incubación a 37°C durante 4 horas. El líquido de cultivo (50 ml) se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para recoger las células, que se resuspendieron en 20 ml de un medio líquido LB. Después de repetir el procedimiento dos veces, las células se resuspendieron en 2 ml de un medio líquido LB.

Se combinaron 100 µl de la suspensión celular de Streptomyces kanamyceticus JCM4775 y 100 µl de la suspensión celular de E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 203-7 en un tubo de 1,5 ml de volumen y se centrifugó para recoger las células, que se resuspendieron en 100 µl de una solución de glicerol al 20% y se extendieron en un medio agar MS de 20 ml de volumen (agar: 2%, manitol: 2%, polvo de soja: 2%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). Después de cultivar a 28°C durante 18 horas, se extendió por encima 1 ml de agua esterilizada que contenía 400 µg de apramicina y 1500 µg de ácido nalidíxico. Después de cultivar a 28°C durante 5 días, se recogió 1 cepa de las colonias de Streptomyces kanamyceticus, se homogenizó con un homogenizador de vidrio y se extendió en medio agar Nutrient (Difco, Nutrient Broth, que contiene agar al 2%) que contiene 20 µg/ml de apramicina y 10 µg/ml de ácido nalidíxico para cultivar a 28°C durante 4 días. Las colonias desarrolladas se inocularon en un medio de siembra, se cultivaron a 28°C durante 48 horas, se mezclaron con la misma cantidad de una solución de leche desnatada al 20%, y después se liofilizó para almacenamiento (cepa Streptomyces kanamyceticus RsAcos3).

#### 5) Detección del sitio recombinante (RsA/RsB) por el método de PCR

Las células liofilizadas (tubo L) de la cepa Streptomyces kanamyceticus RsAcos3 obtenida en 4) descrito anteriormente se inocularon en un medio de siembra, se cultivaron durante 48 horas (1ª generación). Una porción de 1 ml de las células se trasplantó después en un medio de cultivo que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivaron durante 48 horas (2ª generación). Además, una porción de 1 ml de las células se trasplantó en un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación). Después de completar la incubación de la primera, segunda y tercera generaciones, respectivamente, durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. Se usó una porción de 1/10 de las células secas para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en la región RsA y la región RsB por el método de PCR con los ADN cromosómicos en la 1ª, 2ª y 3ª generaciones, respectivamente. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1-2), excepto que los cebadores sintéticos usados son KM-18' (5'-CTCGACAAGGTCTGCAAGCC-3', SEQ ID NO: 11) y M19'L (5'-ATCTTGATTTGAGAGGACCA-3',

SEQ ID NO: 12). Como resultado, se ha revelado que el fragmento de ADN de aprox. 0,9 kb como el objeto no se amplifica con ningún ADN cromosómico, y la cepa Streptomyces kanamyceticus RsAcos3 no tiene capacidad para amplificar la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. Por tanto, se ha mostrado que el gen requerido para la amplificación de ADN está presente en la secuencia de nucleótidos de 33306 a 128995 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

Ejemplo 3: Preparación de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305cura que tiene una delección de una región de ADN de aprox. 37 kb entre las regiones RsC-RsA

Se preparó una cepa Streptomyces kanamyceticus AB305cura que tiene una delección de una región de ADN entre las regiones RsC-RsA (secuencia de nucleótidos 50603 a 87960 en la secuencia de nucleótidos con número de acceso AB254080) en el siguiente método.

#### 1) Construcción de plásmido pAB305

Se amplificó un fragmento A de aprox. 3,4 kb (secuencia de nucleótidos 47230-50602) con el cósmido 2-1 (bibliografía de no patente 2) como molde y AfrU: 5'-GGAGAAGCATGCGAGGACAAGTCGCGGCTTGAAC-3' (SEQ ID NO: 13) y AfrLRV: 5'-CAGGCGGATCCCTGCGATATCCGTAGCGCGCATAAACGAAGAA-3' (SEQ ID NO: 14) como cebadores por el método de PCR. El fragmento se digirió doblemente con BamHI y SphI y se insertó en el sitio BamHI-SphI de pUC118 para dar el plásmido pAB301.

A continuación, un fragmento B de aprox. 3,9 kb (secuencia 87961-91943) se amplificó con el cósmido 1-3 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) como molde y BfrU: 5'-GCAGATGGATCCAGAGTCTAGATTGCTCGTTGATCACCATGTC-3' (SEQ ID NO: 15) y BfrL: 5'-CAGGCGAATTCCGCGTGAATCGCTCCGCATCTT-3' (SEQ ID NO: 16) como cebadores por el método de PCR. El fragmento se digirió doblemente con BamHI y EcoRI y se insertó en el sitio BamHI-EcoRI de pUC118 para dar un plásmido pAB302.

A continuación, el fragmento B derivado de pAB302 (fragmento BamHI-EcoRI) se insertó en el sitio BamHI-EcoRI de pAB301 para dar un plásmido pAB303. Además, para transferir un gen de resistencia tioestreptona (*tsr*) a pAB303, el plásmido pIJ 702 (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwick, 2000) se digirió con BclI, y el fragmento BclI de aprox. 1 kb que contenía el gen *tsr* se insertó en el sitio BamHI de pUC118 para dar un plásmido pUC118str. El plásmido se digirió doblemente con XbaI y SmaI, y el fragmento XbaI-SmaI que contenía el gen *tsr* se insertó en el sitio EcoRV-XbaI de pAB303 para dar un plásmido pAB304 que contiene fragmento A - gen *tsr* - fragmento B como un fragmento de inserción. Además, pAB304 se digirió doblemente con SphI y EcoRI, y el fragmento A - gen *tsr* - fragmento B se aisló como un fragmento SphI-EcoRI de aprox. 8,5 kb y se insertó en el sitio SphI-EcoRI de pSET152 (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwick, 2000) para dar un plásmido pAB305.

#### 2) Preparación de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305 cura y evaluación de capacidad de amplificación de ADN

El plásmido pAB305 se transfirió en una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 según el método normal para dar una cepa E. coli ET12567/pUZ8002/pAB305.

A continuación, la conjugación de Streptomyces kanamyceticus JCM4775 y E. coli ET12567/pUZ8002/pAB305 se llevó a cabo de la misma manera que se ha descrito en ejemplo 2-4). La cepa con resistencia a apramicina obtenida de esta manera confirmó de nuevo su resistencia a tioestreptona con un medio agar Nutrient que contenía 20 µg/ml de apramicina y 10 µg/ml de tioestreptona y denominada como la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305. La PCR llevada a cabo con ADN cromosómico preparado de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305 como molde y los cebadores 4tsrU: 5'-ataagcgcctctgttctcg-3' (SEQ ID NO: 17) y BfrLoutL: 5'-gactcaccctcagccagaat-3' (SEQ ID NO: 18) produjo la amplificación de un fragmento de ADN de aprox. 4 kb. Se ha mostrado del resultado que el plásmido pAB305 se ha incorporado en el ADN cromosómico de Streptomyces kanamyceticus JCM4775 por la recombinación homóloga de la región del fragmento B.

A continuación, se separó una cepa sensible a apramicina y resistente a tioestreptona de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305 en el siguiente procedimiento. La cepa Streptomyces kanamyceticus AB305 se cultivó en un medio de siembra a 28°C durante 48 horas (1ª generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo se inoculó en un medio de cultivo reciente y se cultivó adicionalmente a 28°C durante 48 horas (2ª generación). La misma operación se repitió hasta la quinta generación, y más y después de la tercera generación, se añadieron cinco bolas de vidrio que tenían un diámetro de 5 mm al medio de siembra de modo que los micelios se pudieran desenmarañar fácilmente. El líquido de cultivo de la quinta generación se diluyó de modo que se separara como una única colonia y se extendió en un medio agar Nutrient. Después de 72 horas, la colonia crecida se replicó en un medio agar Nutrient al que se habían añadido tioestreptona (10 µg/ml) y apramicina (20 µg/ml). Como resultado de examinar los fenotipos de 5400 cepas, se obtuvieron 48 cepas sensibles a apramicina, y 7 cepas de ellas mostraron resistencia a tioestreptona. Se preparó ADN cromosómico de estas cepas, que se denominó como la cepa Streptomyces

kanamyceticus AB305cura ya que se ha confirmado por PCR que la secuencia de nucleótidos de 50603 a 87960 entre la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080 se había sustituido por el gen tsr.

5 Para examinar la capacidad de amplificación de ADN de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305cura, la cepa se inoculó en un medio de siembra (40 ml). Se cultivó durante 48 horas (1ª generación), y una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó a un medio de siembra que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Además, una porción de 1 ml del líquido de cultivo se inoculó en un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación). Después de completar el cultivo de la primera y tercera generaciones, respectivamente, durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. La porción de 1/10 de las células secas se usó para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

15 A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en las regiones RsA y RsB con los ADN cromosómicos de la primera y tercera generaciones por el método de PCR de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2). Se ha revelado del resultado que no se detectaron fragmentos de ADN amplificables con el ADN cromosómico de la primera generación, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,2 kb con los ADN cromosómicos de las terceras generaciones, respectivamente, y por tanto la cepa Streptomyces kanamyceticus AB305cura tenía una capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. Por tanto, se ha indicado de comparar la región de delección de la cepa Streptomyces kanamyceticus RsAcos3 que no tenía capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB descrita en el ejemplo 2 que el gen requerido para la amplificación de ADN está presente entre las secuencias de nucleótidos 33306 a 50602 y 87961 a 128995 de número de acceso AB254080.

25 Ejemplo 4: Preparación de una cepa Streptomyces kanamyceticus M27 que tiene delecciones de regiones de ADN de aprox. 37 kb y aprox. 22 kb entre las regiones RsC-RsA y RsA-RsD, respectivamente

30 Se preparó una cepa Streptomyces kanamyceticus M27 que tiene delecciones en la región RsC-RsA (secuencia de nucleótidos 50603 a 87960 de la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080) y la región RsA-RsD (secuencia de nucleótidos 97641 a 120061 de la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080) en el siguiente método.

1) Preparación del cósmido 3-7::AB402

35 El cósmido 3-7 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) se transfirió a una cepa E. coli BW25113/pIJ790 para dar una cepa E. coli BW25113/pIJ790/cósmido 3-7. Un fragmento de ADN que contenía un gen de resistencia a apramicina de aprox. 1,4 kb se amplificó por PCR con un fragmento EcoRI-HindIII de aprox. 1,3 kb descrito en el ejemplo 2-1) como molde y los cebadores 97682U (5'-TCTTCTGTCGTCTCATCCATCGTGCTGGCCTTCGATGACATTCCGGGGATCCGTCGACC-3', SEQ ID NO: 19) y 120181L (5'-GGGAAAGTACGGGAAAAGATCTCGGTTACTCGCGATCCATGTAGGCTGGATCTGCTTC-3', SEQ ID NO: 20). Se preparó la célula competente de la cepa E. coli BW25113/pIJ790/cósmido 3-7 de la misma manera que se describe en el ejemplo 2-1), y la transformación se llevó a cabo por electroporación con el fragmento de ADN que contenía un gen de resistencia a apramicina de aprox. 1,4 kb descrito anteriormente. Se cultivó un transformante que tenía resistencia tanto a apramicina como ampicilina (cepa E. coli BW25113/cósmido 3-7::AB402) para dar el cósmido 3-7::AB402.

2) Preparación de la cepa Streptomyces kanamyceticus M27 y evaluación de la capacidad de amplificación de ADN

50 A continuación, el cósmido 3-7::AB402 se transfirió a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 para dar E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 3-7::AB402. La cepa Streptomyces kanamyceticus AB305cura y la E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 3-7::AB402 se conjugaron de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2-4), y la cepa resistente a apramicina obtenida de esta manera se denominó como la cepa Streptomyces kanamyceticus M27. Se preparó el ADN cromosómico de la cepa Streptomyces kanamyceticus M27, y se confirmó por PCR con una variedad de cebadores que el fragmento de inserción del cósmido 3-7::AB402 se incorporó en el ADN cromosómico de Streptomyces kanamyceticus por recombinación homóloga de doble entrecruzamiento. Por tanto, se ha indicado que la cepa Streptomyces kanamyceticus M27 ha delecionado las regiones de las secuencias de nucleótidos 50603 a 87960 y 97641 a 120061 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

60 Para examinar la capacidad de amplificación del ADN de la cepa Streptomyces kanamyceticus M27, la cepa se inoculó en un medio de siembra (40 ml) y se cultivó durante 48 horas (1ª generación). A continuación, una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó a un medio de siembra que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó adicionalmente a un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación).

65

Después completar el cultivo de la primera y tercera generaciones durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. Una porción de 1/10 de las células secas se usó para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en las regiones RsA y RsB por el método de PCR con los ADN cromosómicos de la primera y tercera generaciones de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1-2). Se ha revelado del resultado que no se detectaron fragmentos amplificables de ADN con el ADN cromosómico de la primera generación, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,2 kb con el ADN cromosómico de la tercera generación y por tanto la cepa Streptomyces kanamyceticus M27 tenía una capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. por tanto, se ha indicado de comparar la región de delección de la cepa Streptomyces kanamyceticus RsAcos3 que no tenía capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB descrita en el ejemplo 2 que el gen requerido para la amplificación de ADN está presente entre las secuencias de nucleótidos 33306 a 50602, 87961 a 97460 y 120062 a 128995 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

Ejemplo 5: Preparación del cósmido AB501 y la cepa M29

Se preparó el cósmido AB501 para preparar una cepa que tenía delecionadas todas las regiones de las secuencias de nucleótidos 29219 a 87960, 97641 a 120061 y 120621 a 139619 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080 por el método descrito a continuación.

1) Preparación y cribado de un genoteca de cósmidos de ADN cromosómico de la cepa Streptomyces kanamyceticus M27

Después de cultivar la cepa Streptomyces kanamyceticus M27 preparada en el ejemplo 4 en un medio de siembra a 28°C durante 48 horas, una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó a 40 ml de un medio líquido YEME modificado (extracto de levadura Difco al 0,3%, bactopectona Difco al 0,5%, extracto de malta Oxoid al 0,3%, glucosa al 0,1%, sacarosa al 3,4%, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mM, glicina al 0,5%) cargado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se cultivó a 28°C durante 24 horas, y las células se recogieron por centrifugación. Las células para cuatro matraces se resuspendieron en 40 ml de un tampón SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM (pH 8), Tris-HCl 20 mM (pH 7,5)). A la suspensión se añadieron 800 µl de una solución de lisozima acuosa 50 mg/ml, y la mezcla se mantuvo a 37°C durante 60 minutos. Se añadieron una porción de 1120 µl de una solución de proteinasa K acuosa 20 mg/ml y 4,8 ml de una solución de SDS al 10%, y la mezcla se calentó a 55°C durante 2 horas. Después de la adición de 16 ml de una solución de NaCl 5 M y 40 ml de cloroformo y suficiente mezclado, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó a 4500 x g y temperatura ambiente durante 15 minutos, y la fase acuosa se echó en un tubo nuevo. La mezcla se diluyó con un volumen de 0,6 veces de isopropanol, y después de 3 minutos el ADN se enrolló alrededor de una pipeta Pasteur con la punta cerrada, se enjuagó con etanol al 70%, se sometió a secado natural y se disolvió en 5 ml de un tampón TE. El ADN obtenido de esta manera tenía una concentración de 0,75 mg/ml.

El ADN cromosómico preparado de esta manera se digirió parcialmente con MboI y se desfosforiló con CIAP (fosfatasa alcalina intestinal de ternera). Por otra parte, se digirió SuperCos 1 (Stratagen) como un vector cósmido con XbaI, después se desfosforiló con CIAP y se digirió adicionalmente con BamHI. Estos se mezclaron y sometieron a reacción de ligación con Mighty Mix 6023 (Takara Bio Inc.) a 26°C durante 10 minutos. La solución de ADN ligada se sometió a empaquetamiento in vitro con extractos de empaquetamiento de lambda MaxPlax™ (EPICENTRE™ Biotechnologies), se transmitió a una cepa E. coli XL1-BlueMRA, y se extendió en medio agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y apramicina (20 µg/ml). Las colonias producidas de esta manera se incubaron en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y apramicina, respectivamente, a 37°C durante la noche para aislar los ADN del cósmido y analizar las secuencias de nucleótidos en ambos extremos del fragmento de inserción de cada cósmido. Se seleccionó el cósmido 1-10 como un clon que contenía NdeI en la posición 29213 y AflIII en la posición 139611 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

2) Preparación del cósmido 203-7::str

Para sustituir e insertar el fragmento NdeI-AflIII (aprox. 33 kb) del cósmido 1-10 en el sitio NdeI-AflIII del cósmido 203-7 descrito en el ejemplo 2-3), se pretendía sustituir el gen de resistencia a apramicina del cósmido 203-7 con un gen de resistencia a estreptomycin. Un fragmento de ADN de aprox. 1,9 kb que contenía el gen de resistencia a estreptomycin se amplificó con el fragmento HindIII-EcoRI derivado de pIJ778 descrito en el ejemplo 2-2) como molde y los cebadores RsA1Ussp (5'-CACGGCACGGAATACCACTGCGTGCCCGTCGACGACAATATTCGGGGATCCGTCGACC-3', SEQ ID NO: 21) y RsA1LRV (5'-CAGACTCTGAGTGATATCTTGATTTGAGAGGACCAAGGTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3', SEQ ID NO: 22). Se transformó E. coli BW25113/pIJ790/cósmido 203-7 por el método de electroporación con este fragmento de ADN. Se preparó un ADN de cósmido de un transformante que es sensible a apramicina, pero resistente tanto a ampicilina como estreptomycin y se denomina cósmido 203-7::str.

### 3) Preparación del cósmido AB501

El producto de triple digestión del cósmido 1-10 con NdeI, DraI y AflII y el producto de doble digestión del cósmido 203-7::str con NdeI y AflII se mezclaron y sometieron a reacción de ligación con Mighty Mix 6023 (Takara Bio Inc.). La solución de ADN después de la reacción se sometió a empaquetamiento in vitro con extractos de empaquetamiento de lambda MaxPlax™ (EPICENTRE™ Biotechnologies), se transmitió a una cepa E. coli XL1-BlueMRA, y se extendió en medio agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y apramicina (20 µg/ml). La sensibilidad a apramicina y resistencia a estreptomina de las colonias se confirmó, y se seleccionaron clones confirmando la recombinación en el sitio NdeI por PCR con KM37 (5'-TCTGCTCACCTCTGCGTCAG-3', SEQ ID NO: 23) y tsrL (5'-TGACGAATCGAGGTCGAGGA-3', SEQ ID NO: 24) derivados de un gen de resistencia a tioestreptona para preparar el cósmido AB501.

Se ha confirmado de la detección de un fragmento de aprox. 8 kb que no se corresponde con el mapa de enzimas de restricción teórico al digerir el cósmido AB501 con KpnI que un fragmento NdeI-AflII derivado del cósmido 1-10 como el fragmento de inserción se delecionó durante el curso de la construcción del cósmido 501. Por tanto, el fragmento XbaI-KpnI de aprox. 4 kb que se estima que contiene la región de delección se subclonó del cósmido AB501 en pUC19 para analizar la secuencia de nucleótidos. Como resultado, se ha revelado que el nucleótido (T) en 120620 y el nucleótido (T) en 139620 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080 se ligaron y por tanto la secuencia de nucleótidos 120621 a 139619 se ha delecionado. En consecuencia, el cósmido AB501 está compuesto de las secuencias de nucleótidos 16650 a 29218, 87961 a 97640, 120062 a 120620 y 139620 a 146821 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080. A este respecto, la secuencia de nucleótidos 114645 a 114723 derivada del cósmido 5-13, que no afecta la preparación de una cepa Streptomyces kanamyceticus M29 descrita a continuación, se añadió en 5' del nucleótido en la posición 16650.

### 4) Preparación de la cepa Streptomyces kanamyceticus M29 y evaluación de la capacidad de amplificación de ADN

Se transfirió el cósmido AB501 a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 para dar E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido AB501. La cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775 y la E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido AB501 se conjugaron de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2-4), y 100 cepas resistentes a apramicina obtenidas de esta manera se extendieron en un medio agar Nutrient que contenía apramicina (20 µg/ml) y tioestreptona (10 µg/ml) para examinar sus sensibilidades a tioestreptona. Las 98 cepas eran sensibles a tioestreptona y se estimó que se generaban por recombinación homóloga de doble entrecruzamiento en las regiones de secuencia de nucleótidos 87961 a 97640 y 139620 a 146821, y por tanto se ha indicado que estas cepas no son la cepa objetivo. Por otra parte, 2 cepas son resistentes a tioestreptona y se estima que se generan por recombinación homóloga con doble entrecruzamiento en las regiones de secuencia de nucleótidos 16650 a 29218 y 139620 a 146821. Además, el análisis por PCR de los ADN cromosómicos de estas dos cepas reveló que la parte del vector del cósmido no estaba insertada en el cromosoma y estas cepas eran las cepas de recombinación homóloga de doble entrecruzamiento, de modo que esta cepa se denominó cepa Streptomyces kanamyceticus M29. La cepa Streptomyces kanamyceticus M29 es una cepa que ha delecionado las regiones de las secuencias de nucleótidos 29219 a 87960, 97641 a 120061 y 120621 a 139619 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

Para examinar la capacidad de amplificación de ADN de la cepa Streptomyces kanamyceticus M29, la cepa se inoculó en un medio de siembra (40 ml) y se cultivó durante 48 horas (1ª generación). A continuación, una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó en un medio de siembra que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó adicionalmente en un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación).

Después completar el cultivo de la primera y tercera generaciones durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. Una porción de 1/10 de las células secas se usó para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en las regiones RsA y RsB con los ADN cromosómicos de la primera y tercera generaciones por el método de PCR de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1-2). Se ha revelado del resultado que no se detectaron fragmentos amplificables de ADN con el ADN cromosómico de la primera generación, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,2 kb con el ADN cromosómico de la tercera generación y por tanto la cepa Streptomyces kanamyceticus M29 tenía una capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. Por tanto, se ha indicado de comparar la región de delección de la cepa Streptomyces kanamyceticus RsAcos3 que no tenía capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB descrita en el ejemplo 2 que el gen requerido para la amplificación de ADN está presente entre las secuencias de nucleótidos 87961 a 97640 y 120062 a 120620 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

### Ejemplo 6: Preparación de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB113-2 y evaluación de la capacidad de amplificación de ADN

1) Preparación del cósmido 5-13::AB113

Un fragmento de ADN de aprox. 1,4 kb se amplificó por PCR con un fragmento EcoRI-HindIII derivado de pIJ773 como molde y los cebadores M13U (5'-GGAGCACTTGCCGGTCTGGCCCAGAACGCGGACCGTCATTCCGGGGATCCGTCGACC-3', SEQ ID NO: 25) y M13L (5'-AGAGCAGTCAGGCTGGCAACCGCACATCCACGCGATCGTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3', SEQ ID NO: 26) según el método descrito en el ejemplo 2-1). Se transformó E. coli BW25113/pIJ7907 cósmido 5-13 por el método de electroporación con este fragmento de ADN, y se obtuvo el cósmido 5-13::AB113 del transformante resistente a apramicina producido de esta manera.

2) Preparación de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB113-2 y evaluación de la capacidad de amplificación de ADN

Se transfirió el cósmido 5-13::AB113 a la cepa E. coli ET12567/pUZ8002 para dar E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 5-13::AB113. La cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775 y la E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 5-13::AB113 se conjugaron de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2-4) para dar una cepa resistente a apramicina. El análisis por PCR del ADN cromosómico de la cepa resistente a apramicina obtenida de esta manera reveló que el cósmido 5-13::AB113 se incorporó en el ADN cromosómico por recombinación homóloga de doble entrecruzamiento por las regiones de ADN derivadas de Streptomyces kanamyceticus en ambos lados del gen de resistencia a apramicina, y esta cepa se denominó como cepa Streptomyces kanamyceticus AB113-2. La cepa Streptomyces kanamyceticus AB113-2 es la cepa que tiene delecionada la secuencia de nucleótidos 118626 a 130558 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

Para examinar la capacidad de amplificación de ADN de la cepa Streptomyces kanamyceticus AB113-2, la cepa se inoculó en un medio de siembra (40 ml) y se cultivó durante 48 horas (1ª generación). A continuación, una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó en un medio de siembra que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó adicionalmente en un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación). Después de completar el cultivo de la primera y tercera generaciones durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. Una porción de 1/10 de las células secas se usó para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en las regiones RsA y RsB por el método de PCR con los ADN cromosómicos de la primera y tercera generaciones de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1-2). Se ha revelado del resultado que no se detectaron fragmentos amplificables de ADN con el ADN cromosómico de la primera generación, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,2 kb con el ADN cromosómico de la tercera generación y por tanto la cepa Streptomyces kanamyceticus AB113-2 tenía una capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. Por tanto, se ha indicado en combinación con los resultados descritos en los ejemplos 2 y 5 que el gen requerido para la amplificación de ADN está presente entre las secuencias de nucleótidos 87961 a 97460 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080.

Ejemplo 7: Preparación de una cepa con interrupción del gen orf1082 y evaluación de la capacidad de amplificación de ADN

Los genes presentes en la secuencia de nucleótidos 87961 a 97640 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080 son 8 genes de orf1079 a orf1086. Entre ellos, el producto del gen orf1082 (SEQ ID NO: 1) mostró identidad con una proteína relevante de ADN, de modo que se preparó el gen orf1082 interrumpido de la manera que se describe a continuación y se evaluó su capacidad de amplificación de ADN.

Un fragmento de aprox. 1,4 kb se amplificó por PCR con un fragmento EcoRI-HindIII derivado de pIJ773 como molde y los cebadores M8U (5'-TCAAGACCTCCGATACGGGCTTCTGTGCCGTTTCAGTTCGAATCCGGGGATCCGTCGACC-3', SEQ ID NO: 27) y M8L (5'-CAACGCCGTCGACCTCTACGGCGAGGACACGGTGGAGAATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3', SEQ ID NO: 28) de la misma manera que se describe en el ejemplo 2-1). Se transformó E. coli BW25113/pIJ790/cósmido 1-3 obtenida transfiriendo el cósmido 1-3 a la cepa E. coli BW25113/pIJ790 por el método de electroporación con este fragmento de ADN, y se obtuvo el cósmido 1-3::AB108 del transformante resistente a apramicina producido de esta manera.

A continuación se obtuvo E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 1-3::AB108 transfiriendo el cósmido 1-3::AB108 a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002. La cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775 y E. coli ET12567/pUZ8002/cósmido 1-3::AB108 se conjugaron de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2-4) para dar una cepa resistente a apramicina. El análisis por PCR del ADN cromosómico de la cepa Streptomyces

kanamyceticus AB1-3(8) entre las cepas resistentes a apramicina obtenidas de esta manera reveló que el cósmido 1-3::AB108 se incorporó en el ADN cromosómico por recombinación homóloga de doble entrecruzamiento por las regiones de ADN derivadas de Streptomyces kanamyceticus en ambos lados del gen de resistencia a apramicina, y que la cepa Streptomyces kanamyceticus AB1-3(8) tenía interrumpido del gen orf1082.

La cepa Streptomyces kanamyceticus AB1-3(8) se inoculó en un medio de siembra (40 ml). Después de cultivar durante 48 horas (1ª generación), una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó después en un medio de siembra que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó adicionalmente en un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación).

Después completar el cultivo de la primera y tercera generaciones durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. Una porción de 1/10 de las células secas se usó para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en la región RsA y la región RsB por el método de PCR con los ADN cromosómicos de la 1ª, 2ª y 3ª generaciones, respectivamente. Como resultado se ha revelado que el fragmento de ADN de aprox. 1,2 kb como el objeto no se amplifica con ninguno de los ADN cromosómicos y la cepa Streptomyces kanamyceticus AB1-3(8) no tiene capacidad de amplificación de la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. Por tanto, se ha mostrado que el gen orf1082 (SEQ ID NO: 2) es el gen esencial para amplificar la región de ADN entre las regiones RsA y RsB.

#### Ejemplo 8: Expresión del gen de melanina insertado en los genes biosintéticos de kanamicina

Los genes biosintéticos de melanina consisten en los genes melC1 y meC2 como los genes derivados de una cepa heteróloga (Bernan, V. et al., Gene, 37, 101-110 (1985): The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from Streptomyces antibioticus and characterization of the gene product) registrado como el número de acceso M11582 en la base de datos de Genbank se insertaron entre las regiones RsA y RsB que estaban presentes en el ADN cromosómico de Streptomyces kanamyceticus JCM4775.

Después de digerir triplemente el plásmido pSET152 con BamHI, SphI y HindIII y someterlo a electroforesis en gel de agarosa, un fragmento BamHI-SphI de aprox. 2,8 kb que contenía un gen de resistencia a apramicina se extrajo del gel y se purificó. Además, para obtener un fragmento de inserción, después de digerir doblemente pKM95 (Yanai, K. & Murakami, T., Journal of Antibiotics, (Japón), 2004, Vol. 57, p. 351-354) con BamHI y SphI y someterlo a electroforesis en gel de agarosa, un fragmento BamHI-SphI de 3,25 kb que contenía el gen biosintético de kanamicina, gen orf9 se extrajo del gel y se purificó. Después de mezclar ambos fragmentos de ADN y ligar con un kit de ligación (Takara Bio Inc.), se transformó E. coli DH5α. Se preparó un plásmido pAB101 de un transformante resistente a apramicina.

A continuación, después de que el plásmido pIJ702 se digiriera triplemente con BamHI, EcoRV y NdeI y se sometiera a electroforesis en gel de agarosa, un fragmento BamHI-EcoRV de 2,97 kb que contenía un gen melC1 y un gen melC2 se extrajo del gel y se purificó. Este fragmento se insertó en el sitio BamHI-EcoRV de un plásmido pAB101 para dar un plásmido pAB102 (9,02 kb).

El plásmido pAB102 se transfirió a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 para dar E. coli ET12567/pUZ8002/AB102. La cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775 y la E. coli ET12567/pUZ8002/AB102 se conjugaron de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2-4) para dar cepas resistentes a apramicina. El análisis por PCR del ADN cromosómico de la cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775/AB102-4 entre las cepas resistentes a apramicina reveló que el plásmido AB102 se incorporó en el ADN cromosómico por recombinación homóloga de entrecruzamiento único por la región de ADN derivada de los genes biosintéticos de kanamicina.

La cepa Streptomyces kanamyceticus JCM4775/AB102-4 se inoculó en un medio de siembra (40 ml). Después de cultivar durante 48 horas (1ª generación), una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó después en un medio de siembra que contenía 250 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Una porción de 1 ml del líquido de cultivo se trasplantó adicionalmente en un medio de siembra que contenía 2000 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (3ª generación).

Después completar el cultivo de la primera, segunda y tercera generaciones durante 48 horas, las células se recogieron centrifugando una porción de 30 ml de cada líquido de cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. Una porción de 1/10 de las células secas se usó para preparar ADN cromosómico con un sistema MFX-6000 (TOYOBO) de la misma que se ha descrito en el ejemplo 1-2).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en la región RsA y la región RsB por el método de PCR con los ADN cromosómicos en la 1ª, 2ª y 3ª generaciones, respectivamente de la misma manera que se describe en el ejemplo 1-2). Se ha revelado del resultado que no se detectaron fragmentos de ADN

amplificables con el ADN cromosómico de la primera generación, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,2 kb con los ADN cromosómicos de la segunda y tercera generaciones y que la región de ADN entre las regiones RsA y RsB que contenía pAB102 se amplificaba en estas cepas.

5 A continuación, después de cultivar las cepas de primera y tercera generaciones de Streptomyces kanamyceticus JCM4775/AB102-4 en un medio de siembra que contenía casaminoácidos al 1%, tirosina al 0,05% y sulfato de cobre al 0,0005% durante 48 horas, y se examinó la cantidad de producción de melanina en el sobrenadante. El examen se llevó a cabo según la modificación parcial del método descrito por Mun, Y. et al., Biological and Pharmaceutical Bulletin, (Japón), 2004, Vol. 27, p. 806 - 809. Es decir, después de mezclar una solución de hidróxido de sodio 2 N que contenía dimetilsulfóxido al 20% y el sobrenadante en una cantidad equivalente y calentar a 80°C durante 30 minutos, se eliminaron flotadores espesos negros para medir la absorbancia de las cepas a 475 nm con un espectrofotómetro Hitachi (U-2810). La cepa de la primera generación mostró una absorbancia de 0,42, y la cepa de la tercera generación mostró una absorbancia de 0,62. Por tanto, se ha revelado que la cepa de la tercera generación produjo una cantidad grande de melanina con el aumento en copias de un gen que produce melanina comparado con la cepa de la primera generación.

#### Ejemplo 9: Amplificación de ADN en Streptomyces kanamyceticus con la región de ADN entre RsC-RsD delecionada

##### 1) Preparación del plásmido pKM2003

20 Se hibridaron Sma-Stu-1 (5'-GGGAGGCCTA-3', SEQ ID NO: 29) y Sma-Stu-2 (5'-AGCTTAGGCCTCCC-3', SEQ ID NO: 30) y se sometieron a ligación con el plásmido pUC119 que preliminarmente se había digerido doblemente con HindIII y SmaI para dar el plásmido pUC119-Stu.

25 A continuación, un fragmento SmaI de aprox. 6,6 kb (secuencia de nucleótidos 88479 a 95063 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080) que contenía la región RsA y el gen orf1082 se preparó a partir del cósmido 1-3 y se insertó en el sitio SmaI de pUC119-Stu. El plásmido obtenido se digirió con KpnI, y se examinó la orientación de un fragmento del inserto para seleccionar un plásmido en el que el sitio KpnI (94889) presente en el fragmento SmaI se insertó en el lado del sitio HindIII de pUC119-Stu, que se designó pKM2001.

30 Un fragmento StuI de aprox. 4,1 kb que consistía en la secuencia de nucleótidos 135493 a 139615 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080 se preparó a partir del cósmido 5-13 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) y se insertó en el sitio StuI de pKM2001, y se seleccionó un plásmido en el que el fragmento StuI se insertó después del fragmento SmaI en la dirección de la secuencia de nucleótidos 135493-139615 y se designó pKM2002.

35 Se digirió el plásmido de transferencia conjugal de Actinomyces pSET152 (Bierman, M. et al., Gene, (Holanda), 1992, Vol. 116, p. 43-49) con SphI, se hizo romo con ADN polimerasa de T4, y después se ligó con un enlazador HindIII (Takara Shuzo Co., Ltd.) para construir pSET153. Un fragmento HindIII-EcoRI de aprox. 2,8 kb derivado de pSET153 y un fragmento HindIII-EcoRI de aprox. 10,7 kb derivado de pKM2002 se ligaron para construir un plásmido de transferencia conjugal pKM2003.

##### 2) Transferencia de pKM2003 a Streptomyces kanamyceticus y evaluación de la capacidad de amplificación del ADN

45 El plásmido pKM2003 se transfirió a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwick, 2000) según el método normal para dar E. coli ET12567/pUZ8002/pKM2003.

50 Como la cepa de Streptomyces kanamyceticus a la que se transfirió pKM2003 se usó la cepa 12-6-4 en la que una región de ADN de 106,6 kb entre las regiones RsC y RsD (secuencia de nucleótidos 28935-135581) en la secuencia de nucleótido de número de acceso AB254080 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666). La cepa Streptomyces kanamyceticus 12-6-4 es la cepa que tiene delecionadas la región RsA y la región entre RsC y RsD que contiene el gen orf1082 y por tanto no tiene capacidad de amplificación de ADN. La cepa Streptomyces kanamyceticus 12-6-4 y E. coli ET12567/pUZ8002/pKM2003 se conjugaron de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2-4). Se llevó a cabo PCR con ADN cromosómico preparado de la cepa resistente a apramicina resultante como molde y KM-25: 5'-CCGCTCTCATTTCGGTTCAG-3' (SEQ ID NO: 31) y KM-202: 5'-CCCCTGACTTTTCGTCGAG-3' (SEQ ID NO: 32) como cebadores para amplificar un fragmento de ADN de aprox. 4,6 kb. Se ha revelado de este resultado que el plásmido pKM2003 se incorporó en el ADN cromosómico de la cepa Streptomyces kanamyceticus 12-6-4 por la recombinación homóloga de la región del fragmento StuI.

65 Esta cepa se inoculó en un medio de siembra (40 ml) para examinar la capacidad de amplificación de ADN de la cepa y se cultivó durante 48 horas (1ª generación), y después una porción de 1 ml del cultivo se trasplantó en un medio de siembra que contenía 500 µg/ml de kanamicina y se cultivó durante 48 horas (2ª generación). Se llevó a cabo adicionalmente subcultivo de la misma manera con kanamicina aumentada a concentraciones de 2000 µg/ml, 4000 µg/ml y 6000 µg/ml para dar líquidos de cultivo de la tercera, cuarta y quinta generaciones, respectivamente.

Una porción de 5 ml del líquido de cultivo de la primera y quinta generaciones, respectivamente, se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos para recoger las células. Se preparó el ADN cromosómico de las células resultantes por el método de la precipitación salina (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwick, 2000).

A continuación, se llevó a cabo un experimento para detectar la recombinación en las regiones RsA y RsB por el método de PCR con los ADN cromosómicos en las 1ª y 5ª generaciones, respectivamente, de la misma manera que se describe en el ejemplo 1-2). A este respecto, KM-201: 5'-CCATCCCGTCGAAGAGCC-3' (SEQ ID NO: 33) se usó en lugar de KM-17' como el cebador de detección de la recombinación. Como resultado, no se detectaron fragmentos de ADN amplificables con el ADN cromosómico de la primera generación, mientras que se obtuvo un fragmento de amplificación de 1,0 kb con los ADN cromosómicos de la quinta generación. Se ha confirmado del análisis de la secuencia de nucleótidos que el fragmento de ADN amplificado era el fragmento de ADN que consistía en la secuencia de nucleótidos anticipada. Se ha revelado del resultado que la cepa Streptomyces kanamyceticus 12-6-4/pKM2003 tenía una capacidad de amplificar la región de ADN entre las regiones RsA y RsB. Por tanto, se ha indicado que el gen requerido para la amplificación de ADN está presente en el fragmento SmaI contenido en pKM2003, es decir, entre la secuencia de nucleótidos 88479 a 95063 en la secuencia de nucleótidos con número de acceso AB254080.

#### Ejemplo 10: Amplificación de ADN en Streptomyces coelicor y Streptomyces lividans

##### 1) Preparación del cósmido pAB801

La mezcla de dos oligonucleótidos A (5'-AATTC CCTGCAGG TCTAGA ACTAGT A-3', SEQ ID NO: 34) y B (5'-AGCTT ACTAGT TCTAGA CCTGCAGG G-3', SEQ ID NO: 35) obtenidos por síntesis química de modificar el extremo 5' con un grupo fosfato se hibridaron y ligaron con pUC19 que preliminarmente se había digerido doblemente con EcoRI y HindIII para construir un plásmido pUC119-enlazador. El sitio de clonación múltiple de este plásmido es EcoRI-SbfI-XbaI-SpeI-HindIII.

Un fragmento XbaI de aprox. 10 kb (que contenía la secuencia de nucleótidos 87961-97640 en la secuencia de nucleótidos con número de acceso AB254080) que contiene la región RsA obtenida del cósmido AB501 descrito en el ejemplo 5 y un gen orf1082 se insertó en el sitio XbaI de pUC119-enlazador para dar el plásmido pAB601. El fragmento XbaI se insertó en la dirección de EcoRI-SbfI-XbaI-RsA-orf1082-XbaI-SpeI-HindIII en el sitio de clonación múltiple de pUC119-enlazador.

A continuación, un fragmento de gen de resistencia a estreptomycin que tiene los sitios SpeI y SbfI en ambos extremos se transfirió en el cósmido pKM7 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 2. Primero, un fragmento de ADN de aprox. 1,9 kb se amplificó por PCR con un fragmento HindIII-EcoRI que contenía un gen de resistencia de estreptomycin obtenido del plásmido pIJ778 como molde y pKM7Δ12U (5'-GATCCCGTGCACACCGAGGGCGAGCTCGCCCCGACTAGTATTCGGATCCGTCGACC-3', SEQ ID NO: 36) y pKM7Δ12L (5'-GTCGGTACCGCCCGTACGACGGCCGGTCCGCCTGCAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3', SEQ ID NO: 37) como cebadores. Este fragmento de ADN se usó para transformar la cepa E. coli BW25113/pIJ790/pKM7 obtenida transfiriendo pKM7 a una cepa E. coli BW25113/pIJ790 por electroporación para dar un clon que es resistente a ampicilina y estreptomycin. El cósmido pKM7::str se aisló de este clon.

A continuación, el cósmido pAB701 en el que un fragmento SbfI-SpeI de aprox. 10 kb derivado del plásmido pAB601 (que contenía la secuencia de nucleótidos 87961-97640 en la secuencia de nucleótidos de número de acceso AB254080) se insertó en el sitio SbfI-SpeI del cósmido pKM7::str se preparó en el siguiente método. El plásmido pAB601 y el cósmido pKM7::str, respectivamente, se digirieron doblemente con SpeI y SbfI, se mezclaron y después se sometieron a reacción de ligación con un kit Rapid DNA Dephos and Ligation (Roche: No. de catálogo 04898125001) según las instrucciones acompañantes. El reactivo ligado se sometió a empaquetamiento in vitro con un kit (kits de empaquetamiento: E. coli XL1-BlueMRA y Extractos de empaquetamiento de lambda MaxPlax™ (EPICENTRE™ Biotechnologies). La mezcla de reacción empaquetada se transmitió a una cepa E. coli XL1-Blue MRA, y se extendió sobre un medio agar LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml). Después de cultivar a 37°C durante la noche, se pudieron detectar clones que crecían en el medio agar. Estos clones pueden contener dos cósmidos (1) contiene pKM7::str y (2) contiene pAB701. El clon que contiene el cósmido objetivo pAB701 es sensible a estreptomycin. Por tanto, cuando cada clon se replicó en un medio agar LB que contenía ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (100 µg/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), 293 cepas entre 369 clones mostraron sensibilidad a estreptomycin. Se preparó un cósmido de estos clones, se confirmó que daba un fragmento de ADN de aprox. 10 kb por doble digestión con SpeI y SbfI y se designó cósmido AB701.

A continuación, el cósmido pAB701 se transfirió en una cepa E. coli BW25113/pIJ790 para dar una cepa E. coli BW25113/pIJ790/pAB701. La cepa BW25113/pIJ790/pAB701 se transformó con el fragmento SspI de 5,2 kb derivado del plásmido pMJCOS1 (Yanai, K. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (USA), 2006, Vol. 103, p. 9661-9666) y se cultivó durante la noche en medio agar LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml). Se preparó un cósmido de las colonias desarrolladas, y se

designó pAB801 (figura 2). El cósmido pAB801 tenía un fragmento Sbfl-Spel de aprox. 10 kb derivado del plásmido pAB601 (que contiene la secuencia de nucleótidos 87961 a 97640 en la secuencia de nucleótidos del número de acceso AB254080) y un fragmento de ADN de aprox. 27,8 kb derivado del cósmido pKM7 (que contiene la secuencia de nucleótidos 7107 a 19547 en la secuencia de nucleótido del número de acceso AB164642 y una secuencia de nucleótidos de 15046 pb de número de acceso AB254081) y además las regiones oriT, attP, int derivadas del plásmido pSET152 en la parte del vector, y por tanto es un cósmido transferible conjugal para Actinomycetes.

(2) Transferencia de cósmido pB801 a Streptomyces coelicolor y Streptomyces lividans y evaluación de la amplificación de ADN

El cósmido pAB801 se transfirió a una cepa E. coli ET12567/pUZ8002 según el método descrito en el ejemplo 2, para dar una cepa E. coli ET12567/pUZ8002/pAB801.

Se propagaron una cepa Streptomyces lividans 1326 y una cepa Streptomyces coelicolor MT1110 en un medio MS (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwich, 2000), se cultivaron a 30°C durante 5 días para formar esporas. Las esporas se recogieron y resuspendieron en 3 ml de agua esterilizada para conservación. Una porción de 200 µl de la suspensión de esporas se combinó con 400 µl de un medio líquido YT 2 X y se trataron calentando a 50°C durante 10 minutos. Por otra parte, la cepa E. coli ET12567/pUZ8002/pAB801 se inoculó en 50 ml de un medio líquido LB que contenía cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C durante la noche. Una porción de 500 µl de este cultivo se trasplantó a un medio líquido LB fresco que contenía cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 4 horas. Las células se recogieron de la cantidad total del cultivo, se lavaron dos veces con un medio líquido LB que no contenía antibióticos y se resuspendieron en 1,5 ml de un medio líquido LB. Una porción de 500 µl de la suspensión se añadió a la suspensión de esporas tratadas con calor. Después de centrifugar la mezcla, se añadieron 50 µl de LB y 50 µl YT 2x para formar una suspensión. 90 µl y 10 µl de la suspensión se extendieron en medio MS, respectivamente, y se cultivaron a 30°C durante la noche, y cada placa se cubrió con 1 ml de agua esterilizada que contenía 0,5 mg de ácido nalidíxico y 1,25 mg de apramicina. Después de cultivar a 30°C durante 3 días, la cepa resistente se desarrolló sobre la superficie entera en la sección de 90 µl extendidos y aproximadamente 1000 de las cepas resistentes por placa se desarrollaron en la sección de 10 µl extendidos. Estas cepas se replicación en medio MS (que contenía ácido nalidíxico 25 µg/ml y apramicina 50 µg/ml) y se cultivaron a 30°C durante 3 días. La cepa resistente a apramicina desarrollada se homogenizó, se extendió en un medio MS (que contenía ácido nalidíxico 25 µg/ml y apramicina 50 µg/ml) y se cultivó a 37°C durante 7 días para tener las esporas adheridas.

Estas esporas se inocularon en un medio líquido SOB (que contenía ácido nalidíxico 25 µg/ml) y un medio líquido SOB (que contenía ácido nalidíxico 25 µg/ml) al que se añadieron 250 µg/ml de kanamicina y se incubó a 30°C durante 48 horas. Las células se recogieron de cada líquido de cultivo, y se preparó ADN cromosómico por el método de la precipitación salina (Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, (Inglaterra), Norwich, 2000). La recombinación de ADN se detectó en las regiones RsA y RsB con estos ADN cromosómicos como moldes según el método descrito en el ejemplo 1. Como resultado, no se detectaron fragmentos de amplificación de 1,2 kb en la sección de cultivo a la que no se había añadido kanamicina, mientras que el fragmento de amplificación de 1,2 kb se pudo detectar en la sección de cultivo a la que añadió kanamicina. Por tanto, se ha revelado que la región de ADN entre las regiones RsA y RsB se amplificó en las cepas Streptomyces lividans 1326 y Streptomyces coelicolor MT1110 a las que se había transferido el cósmido pAB801.

#### Lista de secuencias

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, Ltd.

<120> Un método para la amplificación de ADN en una célula

<130> 178646PX

<150> JP 2008-147927

<151> 05-06-2008

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1481

<212> PRT

<213> Streptomyces kanamyceticus

ES 2 534 239 T3

<400> 1

Met Gly Trp Val Thr Met Ile Gly Pro Ser Asp Gly Gln Val Glu Tyr  
 1 5 10 15

Arg Leu Thr Gly Gly His Gly Cys Gly Lys Ser Val Ala Val Asp Ala  
 20 25 30

Ala Pro Leu Ile Ala Ala Ile Glu Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly Ala  
 35 40 45

Pro Val Ala Ser Leu Leu Ala Asn Arg Glu Ala Lys Arg Ala Phe Phe  
 50 55 60

Arg Ala Arg Gly Leu Leu Arg Ser Lys Gly Ala Ala Arg Phe Thr Gly  
 65 70 75 80

Phe Asp Ala Val Glu Val Ala Ala Ala Ala Gly Leu Asp Ala Arg Asp  
 85 90 95

Leu Tyr Gly Glu Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Ser Asp Gly Gln Val  
 100 105 110

Asp Tyr His Leu Asp Ala Ser Glu Arg Pro Leu Val Trp Ile Gly Gly  
 115 120 125

Gly Leu Thr Glu Phe Asp Ile Thr Pro Gly Ser Thr Leu Val Pro Glu  
 130 135 140

Gln Phe Ala Ala Ala Arg Arg Leu Met Leu Gly Glu Asp Pro Arg Thr  
 145 150 155 160

Gly Gln Thr Arg Val Glu Pro Lys Leu Ala Ile Ala Ser Ala Ala Lys



ES 2 534 239 T3

Ser Gly Phe Ser Gly Trp Met Met Val His Arg Ala Ala Arg Pro Val  
 420 425 430

Asp Gly Ala Pro Tyr Gly Asp Pro His Phe His Leu His Phe Thr Leu  
 435 440 445

Ala Asn Met Val Lys Gly Ala Asp Gly Lys Trp Ser Thr Met Ala Ser  
 450 455 460

Gly Gly Arg Asp Leu His Arg His Thr Arg Ala Thr Gln Ser Leu Met  
 465 470 475 480

Asn Ala Arg Ile Arg Arg Glu Leu Thr Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe  
 485 490 495

Arg Arg Glu Glu Arg Thr Gly Ala Trp Glu Ile Ala Ala Ile Pro Glu  
 500 505 510

Ala Thr Ile Arg Leu Phe Ser Lys Arg Asp Ser Gln Val Arg Asp Leu  
 515 520 525

Leu Thr Lys Leu Gly Ile Asp Tyr Asp Ser Ala Thr Thr Arg Glu Arg  
 530 535 540

Thr Ala Ala Ser Thr Ala Ser Lys Ala Ala Lys Asn Gly Glu Ala Ala  
 545 550 555 560

Gly Val Gly Asp Asp Val Leu Arg Ala Tyr Trp Gln Ala Glu Gly Arg  
 565 570 575

Ala Ala Gly Asp Asp Pro Asp Ala Ile Ala Ala Ser Ala Met Glu Gln  
 580 585 590

Asp Arg Ala Asp Gln Asn Pro Thr Leu Asp Glu Leu Cys Ala Gln Val  
 595 600 605

Phe Asp Pro Lys Thr Gly Leu Thr Ser His Ser Lys Glu Phe Thr His  
 610 615 620

Ala Ala Ala Ile Ala Ala Val Leu Asp Ala Leu Pro Tyr Gly Val Ala  
 625 630 635 640

Asp Ala Ala Glu Ala Glu Gln Leu Thr Asn Ser Val Leu Arg Gln Ala  
 645 650 655

Gly Tyr Ala Val Gln Leu Ser Pro Lys Gly Ala Gln His Phe Ala His  
 660 665 670

ES 2 534 239 T3

Ala Glu Arg Tyr Thr Thr Ala Asp Val Val Ala Ala Glu Ala Leu Ile  
675 680 685

Val Ser Glu Ala Thr Asn Arg Leu Gly Thr Gln Ala Ala Val Val Ser  
690 695 700

Ser Asp Thr Val Asp Met Thr Leu Ser Thr Val Glu Ala Gln His Gly  
705 710 715 720

Gly Ser Phe Thr Phe Ser Asp Glu Gln Arg Ala Val Leu Glu Arg Leu  
725 730 735

Leu Thr Ala Gly His Gly Ile Asp Ala Val Val Gly Ile Ala Gly Ala  
740 745 750

Gly Lys Thr Thr Ile Met Asp Thr Ala Arg Gln Ala Trp Glu Ala His  
755 760 765

Gly Leu Val Ile Ala Gly Ala Ser Thr Ala Ala Val Ala Ala Ala Asn  
770 775 780

Leu Lys Ala Glu Ala Gly Ile Glu Ser Arg Thr Leu Ala Ser Trp Leu  
785 790 795 800

Thr Gly Ile Arg Asn Gly Gly Ser Gly Leu Thr Gly Val Asp Val Leu  
805 810 815

Val Val Asp Glu Ala Ala Met Cys Asp Asp Arg Asp Ile Ala Glu Leu  
820 825 830

Leu Thr His Ala Ala Glu Thr Asp Thr Lys Ile Val Gly Ile Gly Asp  
835 840 845

Pro Lys Gln Leu His Ser Pro Gly Ile Gly Gly Ser Phe Ala Ala Val  
850 855 860

His His Ile Val Gly Gly Leu Thr Leu Ser Gln Asn Phe Arg Gln Lys  
865 870 875 880

Asp Met Val Glu Arg Arg Ala Leu Glu Leu Trp Arg Asp Asp Asn Arg  
885 890 895

Val Glu Ser Leu Arg Ile Phe Ala Gly Thr Gly Arg Val His Ala Leu  
900 905 910

Ala Asp Lys Asp Ala Thr Leu Ala Ala Met Leu Thr Val Trp Ala Asp  
915 920 925

ES 2 534 239 T3

Lys Arg Ala Ala His Thr Asp Asp His Thr Ala Val Gln Gln Leu Leu  
 930 935 940

Met Leu Ala Ala Thr Asn Glu Ile Val Glu Glu Leu Asn Thr Gly Ala  
 945 950 955 960

Arg Ala Leu Arg Lys Glu Asn Gly Asp Leu Thr Gly Pro Glu His Ala  
 965 970 975

Tyr Ala Leu Pro Gly Gly Gly Glu Leu Thr Leu Ser Val Gly Asp Gln  
 980 985 990

Val Leu Leu Arg Val Asn Asp Tyr Arg Gly Lys Lys Ser Arg Gly Ala  
 995 1000 1005

Ser Glu Asp Val Leu Asn Gly Tyr Arg Gly Ile Val Arg Ala Val  
 1010 1015 1020

Asp Glu Glu Arg Arg Val Leu Val Glu Trp Arg Glu Lys Thr Glu  
 1025 1030 1035

Asp Gly His Arg Asp Val Ala Glu Trp Ile Asp Ala Asp Tyr Ile  
 1040 1045 1050

Ala Gln Gly Gly Leu Ser Leu Gly Tyr Ala Ile Thr Gly His Lys  
 1055 1060 1065

Ser Gln Gly Leu Thr Val Gln Glu Ala Leu Val Tyr Gly Pro Gly  
 1070 1075 1080

Ala Gln Ala Asn Ala Leu Tyr Thr Met Met Ser Arg Asp Lys Ala  
 1085 1090 1095

Glu Ser His Leu Phe Leu Pro Leu Ser Val Tyr Glu Thr Asp Ala  
 1100 1105 1110

Asp Arg Ala Arg His Gly Asp Ala Leu Thr Asp Gln Glu Gln Leu  
 1115 1120 1125

Asp Arg Ala Val Ser Gly Leu Ile Arg Glu Ile Glu Asn Gly Thr  
 1130 1135 1140

Glu Glu Arg Met Ile Leu Thr Glu Leu Pro Lys Asn Ala Val Pro  
 1145 1150 1155

Ala His Val Arg Gln Ala Val Ala Asp Leu Pro Ile Pro Arg Ala

ES 2 534 239 T3

1160						1165								1170
Pro Gly	Ala Asp	Glu His	His	Asp Ala	Asp Thr	Pro	Glu Glu	Thr	Pro	Glu Glu	Thr			
1175						1180								1185
Pro Asp	His Glu	Asp Arg	Pro	Ile Leu	Ala Asn	Ala	Glu Pro	Thr	Ala	Glu Pro	Thr			
1190						1195								1200
Thr Glu	Ser Ala	Thr Arg	Ser	Glu Pro	Ala Pro	Thr	Ala Asp	Arg						
1205						1210								1215
Pro Tyr	Ala His	Leu Gly	Asn	Ser Ala	Leu Arg	Asp	Ala Val	Arg						
1220						1225								1230
Lys Ala	Ala Ile	Ala Ala	Arg	Ala Thr	Thr Ala	Ala	Ala Asp	Lys						
1235						1240								1245
Ala Glu	Gly Ala	Ala Asp	Arg	Ala Glu	Gln Glu	Ala	Ala Ala	Gly						
1250						1255								1260
Ala Gly	Pro Lys	Ser Leu	Ala	Leu Gln	Arg Arg	His	Gln Asp	Val						
1265						1270								1275
Ala Glu	Arg Ala	Val Ala	Ile	Arg Glu	Val Leu	Leu	Leu Asp	Gly						
1280						1285								1290
Thr Ile	Ala Glu	Arg Thr	Ala	Arg Leu	Asn Gly	Thr	Glu Ala	Arg						
1295						1300								1305
Ile Gly	Gly Leu	Glu Gln	Gln	Leu Ala	Ala Thr	Gly	Arg Phe	Gly						
1310						1315								1320
Arg Ala	Ala Leu	Arg Gly	Asp	Glu Arg	Ala Ala	Val	Glu Ala	Asp						
1325						1330								1335
Arg Glu	Ala Leu	Leu Arg	Thr	Arg Glu	Glu Thr	Val	Gln Glu	Leu						
1340						1345								1350
Glu Gln	Met Asp	Thr Arg	Leu	Gln Asp	Val Thr	Arg	Gln Ala	Gly						
1355						1360								1365
Pro Val	Asn Glu	Tyr Glu	Ala	Val Leu	Arg Glu	Ala	Asp Met	Pro						
1370						1375								1380
Gln Gln	Glu Lys	Ala Ala	Leu	Leu Arg	Arg Ala	Lys	Ala Lys	Asp						
1385						1390								1395

ES 2 534 239 T3

Asn Glu Ala Ala Lys Gln Leu Arg Ala Glu Ala Ile Lys Ala Arg  
 1400 1405 1410

Ser Thr Ala His Gly Ala Asp His Arg Met Ser Gly Leu Gln Lys  
 1415 1420 1425

Glu Ala Ser Leu Arg Ala Glu His Gly Arg Gln His Val Asp Ala  
 1430 1435 1440

Glu Glu Ala Ala Ala Pro Ser Ser Pro Lys Pro Asp Ser Ser Tyr  
 1445 1450 1455

Ala Asn Arg Thr Ala Met Gly His Thr Gln Ala Ala Pro Pro Asp  
 1460 1465 1470

Ser Ala His Asp Ala Pro Pro Val  
 1475 1480

<210> 2

<211> 4446

<212> ADN

<213> Streptomyces kanamyceticus

5

<400> 2

atgggatggg tgaccatgat cggcccctcc gacgggcagg ttgagtaccg ccttaccggc 60  
 ggccacggat gcgggaagtc cgtcgcggtc gacgccgcgc ccctcattgc cgccatcgag 120  
 gcgaaggccg aagccgccgg tgccccctgc gcctccctgc tcgccaaccg cgaggccaag 180  
 cgcgccttct tccgtgcccg cggactcctc cgcagcaagg gcgctgcgcg gttcaccggg 240  
 ttcgacgccg ttgaagtcgc cgccgcagcc gggctcgacg cccgcgacct ctacggcgaa 300  
 caggcccttc ccccgagagc ctccgacgga caggtggact accacctgga cgccagcgaa 360  
 aggcccctgg tctggatcgg cggcgggctc accgagttcg acatcacgcc cggcagcacc 420  
 ctcgtccccg agcagttcgc ggccgcccgg cgcctcatgc tcggggaaga cccccggacc 480  
 gggcagaccc gcgtggaacc caagctggcc atcgcctcgg ccgccaaact ccccgccgcc 540  
 ccaactggccc gcgccatccg tcgcgccgcc gccgaacgca gcgtgaacct gacctccctg 600  
 ctcgattcca agcgcaagca ggacgcattc cgccggatgg agagccagct caagcgattc 660  
 ggcgagacgc accgcgtccc cgtctcgacg gtgctgaagc tcgccgatgc cgtcggcatc 720  
 aacgccgtcg acctctacgg cgaggacacg gtggagaagg ccgtcgccgc cgaggcgggc 780  
 ggtcacctgg acgcccgtgc cctcctgcgc gcggtcgagg cccgcgccgc cgagaccgga 840  
 cagcagcccg ccgacctgtt cgacgcggcg tccatgaagc gccgatacgc ccagaccgaa 900  
 ggcgaagggtg gccgtcgtct ccgggacctg ccgatggatg tccgcgaagc cgtcgcgatg 960  
 gcccaaggcgg cagggctcac gcccgaggac gtgtgggacg ccgaggagat caaggccgcc 1020

ES 2 534 239 T3

ctctcgaag gtcgctgca ggtcggcaac cgcggtgccg acgtcacctt ggacctggcg 1080  
 aagtcgaagt ccgcttccct cgcgtacgcg cccgaggaga tcgcccacca ggtcgagggc 1140  
 atctacacga ccgcccggcg cgagtccatc ggcgccctgg agcggtaggac cgcgtacgcc 1200  
 atgcgcggcc accacggcga cggcgaagaa gcgagatcg tgaagacgag cgggttctcc 1260  
 ggctggatga tggccaccg cgcgcgccg cccgtcgacg gagccccgta cggggacccc 1320  
 cacttccacc tgcacttcac cctcgccaac atggtcaagg gcgcccacgg caagtggctc 1380  
 acgatggcca gtggggggcg cgatctccac cggcacaccc gcgcgacca gtccctcatg 1440  
 aacgccgca tccgcccga gctgaccgac acgttcggca tcagcttccg tcgtgaggag 1500  
 cggaccggag cctgggagat cgcagcgatt cccgaggcca cgatccggct gttcagcaag 1560  
 cgcgacagcc aggtccggga cctgctgacg aaactcggca tcgactacga cagcgccacg 1620  
 acccgcgagc gtaccgccc ctcaccgcg tccaaggccg cgaagaacgg cgaggccgcc 1680  
 ggggtcgggg acgatgttct ccgcccctac tggcaggccg agggccgggc ggccggagac 1740  
 gaccccgacg ccatcgcagc cagcgcgatg gaacaggacc gagcagacca gaaccccacc 1800  
 ctggacgagc tgtgcgccca ggtcttcgac ccgaagaccg gtttgaccag cactccaag 1860  
 gagttcacc acgcccgcg catcgccgc gtgctggacg ccctcccgta cggcgtcgcg 1920  
 gacgccgccc aggcgaaca gctcaccaac tccgtactgc ggcaagccgg gtacgcggtc 1980  
 cagctcagcc cgaagggcgc ccagcacttc gcgcacgccg agcggtagac cacggcggat 2040  
 gtcgtggcgg ccgaagcgc gatcgtctcc gaagccacga accggctcgg gactcaggcc 2100  
 gccgtcgtca gcagcgacac ggtcgacatg acgctgtcca ccgtcgaggc ccagcacggt 2160  
 ggagcttca cgttctccga cgaacagcgt gccgtcctcg aacggctgct cacggccggg 2220  
 cacggaatcg acgcccgtc gggcatcgcc ggagcgggca agaccacgat catggacacc 2280  
 gcgcggcagg cgtgggaggc gcacggcttc gtcacgcgc gcgcgagcac ggccgccgtc 2340  
 gcccccgga acctgaaggc cgaggcgggc atcgagtccc gcaccctcgc gtcctggttg 2400  
 accggcatcc gcaacggagg ctccggcctc accggcgtgg acgtgttggc cgtggacgag 2460  
 gccgcgatgt gcgatgaccg cgacatcgcc gaactcctca cccacgccgc ggaaaccgac 2520  
 acgaagatcg tcggtatcgg tgaccccaag cagctccact cgcccggcat cggcgggtcc 2580  
 ttcgctgccg tgcaccacat cgtcggcgga ctaccctca gccagaattt ccgcccagaag 2640  
 gacatggtcg agcgcgggc actggagctc tggcgcgacg acaaccgctt ggaatcgctc 2700  
 cgcattctcg ccgggaccgg gcgcgtgcac gctctcgcgg acaaggacgc caccctcgcc 2760  
 gcgatgctca ccgtctgggc cgacaagcgg gccgcgcaca ccgacgacca caccgccgtg 2820  
 cagcagctcc tcatgctcgc cgccaccaac gagatcgtgg aagagctgaa caccggcgcc 2880

ES 2 534 239 T3

cgcgactgc ggaaggagaa cggcgacctc accggccccg agcacgcata cgcgctgccc 2940  
 ggtggcgggc agctgaccct gtccgtcggc gaccaggtcc tcctacgggt caacgactac 3000  
 cgaggcaaga agagccgagg cgcgagcgaa gacgtcctga acggctaccg cggaatcgtg 3060  
 cgagccgtgg acgaggaacg ccgggtgctg gtcgagtggc gagagaagac cgaggacggc 3120  
 caccgcgacg ttgccgaatg gatcgacgcc gactacatcg cacagggcgg actcagcctc 3180  
 ggatacgcga tcaccggcca caagtgcgag ggcctcaccg tccaagaggc cctgggtctac 3240  
 ggaccgcggc ctcaggcgaa cgccctctac accatgatgt cgagggacaa ggccgagtcc 3300  
 cacctcttcc tgccgctctc cgtctacgag accgacgccg accgcgcccg ccacggcgac 3360  
 gcactcaccg accaggagca gcttgaccgc gccgtctcgg gcctcatccg cgagatcgag 3420  
 aacggcaccg aggaacgcat gatcctcacc gaactcccca agaacgcggt ccccgcccac 3480  
 gtccgtcagg ccgtagcgga cctcccgatc ccgcgagccc cgggcgccga cgagcaccac 3540  
 gacgccgaca ctcccgagga gactccggac cacgaggacc gcccatact ggccaacgcc 3600  
 gagccgacca cggagtcggc cacacgttcg gaacccgcgc cgacggctga ccgtccatac 3660  
 gctcacctcg gtaactcggc actgcgtgac gccgtgcgca aggctgccat cgccgcccgc 3720  
 gccacgacgg cggcgccgga caaggcggaa ggcgcccgcg atcgtgccga acaggaggct 3780  
 gctgccggag caggccccaa gtcgctcggc ctccaacgcc gtcacagga cgttgccgaa 3840  
 cgggccgtgg ccatccgcga agtcctgttg ctggacggca cgatcgcgga acgcaccgct 3900  
 cgactgaacg gcacagaagc ccgtatcgga ggtcttgaac agcagctggc cgcgacgggc 3960  
 cgtttcggcc gggcggcact ccgtggtgac gagcgtgctg cggtcgaggc agaccgggaa 4020  
 gcactccttc gtaccctgta ggagaccgtc caggagctgg agcagatgga cacgcggctc 4080  
 caggacgta cccggcaggc cggaccgctc aacgagtacg aagcagtgct gaggggaagcg 4140  
 gacatgccgc agcaggagaa ggccgcgctg cttcggcggg ccaaggccaa ggacaacgag 4200  
 gcagccaagc agctccgggc cgaggccatc aaggctcgca gcactgctca cggcgcagac 4260  
 caccgcatgt ccggcctcca gaaggaggcg agtctgcgag ctgagcacgg gcgtcagcac 4320  
 gtcgacgccg aagaggccgc ggcgccctca tctccgaaac ccgactcctc gtacgccaac 4380  
 cgaaccgcga tgggccacac acaggccgca ccgccggaca gcgctcacga cgcaccgccc 4440  
 gtgtag 4446

<210> 3  
 <211> 34  
 5 <212> ADN  
 <213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 3  
**gaagtgacga taccttggtc ctctcaaadc aaga** 34

10 <210> 4  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces kanamyceticus

	<400> 4	<b>accacgacga caccctggtc cgcgcggagg aggt</b>	<b>34</b>
5	<210> 5 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> cebador: KM-16'		
	<400> 5	<b>ccggcacttc cgctccaa</b>	<b>18</b>
15	<210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> cebador: KM-17'		
	<400> 6	<b>gcgggttcgc caactcca</b>	<b>18</b>
25	<210> 7 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> cebador: RsA1U		
35	<400> 7	<b>cacggcacgg aataccactg cgtgcccgtc gacgacggta ttccggggat ccgtcgacc</b>	<b>59</b>
40	<210> 8 <211> 94 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> cebador: RsA1L		
	<400> 8	<b>ccaggtcggg aagggtgctc tccgcgcgag cggaggtgat atcttgattt gagaggacca</b>	<b>60</b>
		<b>aggatatcgtc acttctgtag gctggagctg cttc</b>	<b>94</b>
50	<210> 9 <211> 61 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> cebador: RsA2U		
	<400> 9	<b>ctcgcgcggg agcaccacag gctgcctgca gaaaactgta cattccgggg atccgtcgac</b>	<b>60</b>
	<b>c</b>		<b>61</b>

ES 2 534 239 T3

<210> 10  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador: RsA2L  
 <400> 10  
 10 **agttcgcatc gcccatctaa ggaactggtg ggccttagct gtaggctgga gctgcttc** 58  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: KM-18'  
 20 <400> 11  
**ctcgacaagg tctgcaagcc** 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: M19'L  
 30 <400> 12  
**atcttgattt gagaggacca** 20  
 <210> 13  
 35 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador: AfrU  
 <400> 13  
**ggagaagcat gcgaggacaa gtcgoggctt gaac** 34  
 45 <210> 14  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador: AfrLRV  
 <400> 14  
 55 **caggcggatc cctgcatat ccgtagcgcg cataaacgaa gaa** 43  
 <210> 15  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: BfrU  
 <400> 15

**gcagatggat ccagagtcta gattcagctc gttgatcacc atgtc** **45**

<210> 16  
 <211> 34  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: BfrL

10 <400> 16  
**caggcgaatt ccgctggaa tcgctccgca tctt** **34**

<210> 17  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> cebador: 4tsrU

<400> 17  
**ataagcgct ctgttcctcg** **20**

25 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador: BfrLoutL

<400> 18  
**gactcaccct cagccagaat** **20**

35 <210> 19  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador: 97682U

<400> 19  
 45 **tcttctgtcg tctcatccat cgtgctggcc ttcgatgaca ttccggggat ccgtcgacc** **59**

<210> 20  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: 120181L

55 <400> 20  
**gggaaagtac gggaaaagat ctcggttact cgcgatccat gtaggctgga tctgcttc** **58**

<210> 21  
 <211> 59  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: RsA1Ussp

ES 2 534 239 T3

<400> 21  
**cacggcacgg aataccactg cgtgcccgtc gacgacaata ttccggggat ccgtcgacc** 59

5 <210> 22  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador: RsA1LRV

<400> 22  
**cagactctga gtgatatctt gatttgagag gaccaaggtt gtaggctgga gctgcttc** 58

15 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador: KM37

<400> 23  
 25 **tctgctcacc tctgcgtcag** 20

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: tsrL

35 <400> 24  
**tgacgaatcg aggtcgagga** 20

<210> 25  
 <211> 59  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: M13U

45 <400> 25  
**ggagcacttg ccggtctggc ccagaacgcg gacgccgtca ttccggggat ccgtcgacc** 59

<210> 26  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 55 <223> cebador: M13L

<400> 26  
**agagcagtca ggctggcaac cgcacatcca cgcgatcggt gtaggctgga gctgcttc** 58

60 <210> 27  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 534 239 T3

<220>  
 <223> cebador: M8U

<400> 27  
 5 **tcaagacctc cgatacgggc ttctgtgccg ttcagtcgaa ttccggggat ccgtcgacc** 59

<210> 28  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: M8L

<400> 28  
 15 **caacgccgtc gacctctacg gcgaggacac ggtggagaat gtaggctgga gctgcttc** 58

<210> 29  
 <211> 10  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: Sma-Stu-1

<400> 29  
 25 **gggaggccta** 10

<210> 30  
 <211> 14  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: Sma-Stu-2

<400> 30  
 35 **agcttaggcc tccc** 14

<210> 31  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: KM-25

<400> 31  
 50 **ccgtctcat tcggtcag** 18

<210> 32  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador: KM-202

<400> 32  
 60 **cccctgactt tcgtcgag** 18

<210> 33  
 <211> 18  
 <212> ADN

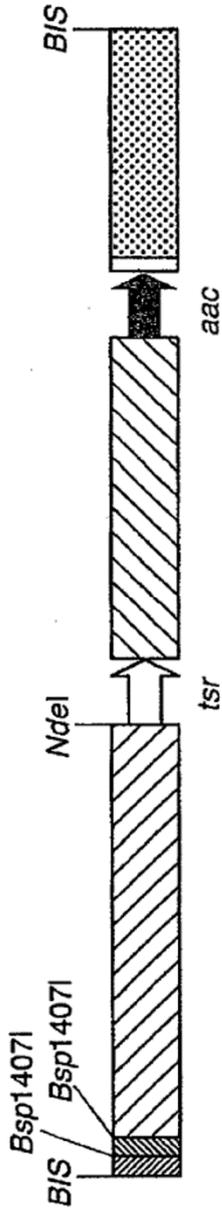
ES 2 534 239 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador: KM-201	
5	<400> 33	
	<b>ccatcccgtc gaagagcc</b>	<b>18</b>
10	<210> 34	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador: Oligonucleótido A	
	<400> 34	
	<b>aattccctgc aggtctagaa ctagta</b>	<b>26</b>
20	<210> 35	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador: Oligonucleótido B	
	<400> 35	
30	<b>agcttactag ttctagacct gcaggg</b>	<b>26</b>
	<210> 36	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador: pKM7 12U	
	<400> 36	
40	<b>gatccccgtg cacaccgagg gcgagctcgc cccgactagt attccgatcc gtcgacc</b>	<b>57</b>
	<210> 37	
	<211> 59	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador: pKM7 12L	
50	<400> 37	
	<b>gtcggtcacc gcccgtagca cggccggttc gcgctgcagg tgtaggctgg agctgcttc</b>	<b>59</b>

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para amplificar ADN, que comprende:
- 5 preparar una célula recombinante que comprende cualquiera de los polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los siguientes (A) a (E) y una unidad de ADN dispuesta en el genoma celular,
- 10 en donde la unidad de ADN tiene un tamaño de 22 a 154 kb y al menos comprende un primer fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (F) a (H), un gen diana y un segundo fragmento de ADN seleccionado de los siguientes (I) a (K), el gen diana o polinucleótido es exógeno al huésped,
- 15 cultivar la célula recombinante en condiciones adecuadas para producir la amplificación génica para amplificar la unidad de ADN,
- (A) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- (B) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene la delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que es funcionalmente equivalente a esa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- 20 (C) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y que es funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- (D) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2,
- (E) un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 en condiciones rigurosas, y que codifica una proteína funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- 25 (F) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,
- (G) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en condiciones rigurosas, y
- (H) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,
- (I) ADN representado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4,
- (J) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 en condiciones rigurosas, y
- 30 (K) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde la unidad de ADN comprende en orden desde el extremo 5' el primer fragmento de ADN, el gen diana y el segundo fragmento de ADN.
- 40 3. El proceso según la reivindicación 1, en donde el gen diana consiste en un complejo génico biosintético de antibióticos.
4. El proceso según la reivindicación 1, en donde la unidad de ADN comprende además un gen de resistencia a un fármaco.
- 45 5. El proceso según la reivindicación 1, en donde el polinucleótido es ADN y está dispuesto en el genoma de la célula recombinante.
- 50 6. El proceso según la reivindicación 1, en donde el huésped es una cepa productora de antibiótico.
7. Una célula recombinante, en donde se introducen múltiples copias de la unidad de ADN en un genoma por el proceso según la reivindicación 1.
- 55 8. La célula recombinante según la reivindicación 7, en donde el gen diana es exógeno a un huésped.
9. Uso de una composición para amplificar ADN por el proceso según la reivindicación 1, la composición comprende una proteína seleccionada de:
- 60 1) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- 2) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que es funcionalmente equivalente a la que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y
- 65 3) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que es funcionalmente equivalente a la que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

10. Uso de un vector para amplificar ADN por el proceso según la reivindicación 1, el vector comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en (A) a (C) en una forma operativa:
- 5 (A) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,  
(B) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una delección, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y que es funcionalmente equivalente a la que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y
- 10 (C) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y que es funcionalmente equivalente a la que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 15 11. Uso de un vector para amplificar ADN por el proceso según la reivindicación 1, el vector comprende una unidad de ADN que tiene un tamaño de 22 a 154 kb y al menos comprende un primer fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (F) a (H), un gen diana y un segundo fragmento de ADN seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (I) a (K), y el vector que es capaz de introducir la unidad de ADN en un genoma celular:
- 20 (F) ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,  
(G) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en condiciones rigurosas, y  
(H) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3,
- 25 (I) ADN representado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4,  
(J) ADN que hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 en condiciones rigurosas, y  
(K) ADN que tiene una identidad del 90% o más respecto a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
- 30 12. El proceso según la reivindicación 1, en donde la unidad de ADN es exógena al huésped.



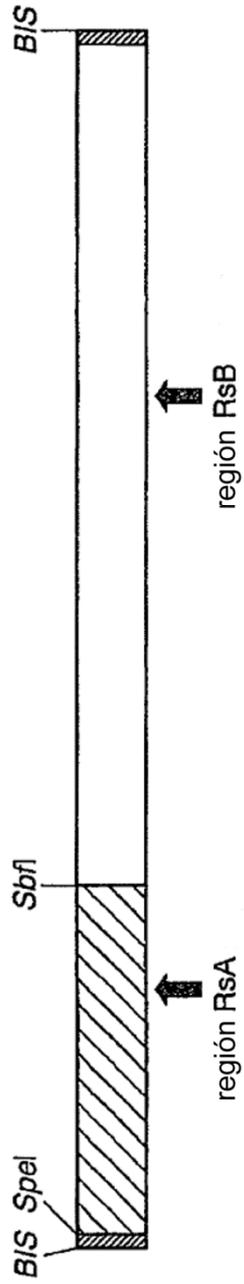
**BIS** : Parte de unión de *Bam*HI y *Sau*3AI

**tsr** : gen de resistencia a tioestreptona

**aac** : gen de resistencia a apramicina

- : secuencia de nucleótidos 114645 a 114726 de AB254080
- : secuencia de nucleótidos 123007 a 123183 de AB254080
- : secuencia de nucleótidos 16650 a 29218 de AB254080
- : secuencia de nucleótidos 87961 a 97640 de AB254080
- : secuencia de nucleótidos 120062 a 120620 de AB254080
- : secuencia de nucleótidos 139620 a 146821 de AB254080

**FIG. 1**



*B/S* : Parte de unión de *Bam*HI y *Sau*3AI

 : región de ADN derivada de pKM7

 : secuencia de nucleótidos de 87961 a 97640 de AB254080

 : secuencia de nucleótidos de 7107 a 19547 de AB164642 y secuencia de nucleótidos 1 a 15046 de de AB254081

FIG. 2