

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

(21) **PI0520842-4 A2**

(62) Data de Depósito do Pedido Original:
PI0520842 - 21/12/2005

(22) Data de Depósito: 21/12/2005

(43) **Data da Publicação: 05/10/2010**
(RPI 2074)



(51) **Int.Cl.:**

C12N 15/77

C07K 14/34

Notificação de Depósito de Pedido Dividido:
RPI 2074 de 05/10/2010

(54) Título: **UNIDADE DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE COMPREENDENDO PROMOTOR MÚLTIPLO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR, MICROORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO, PROCESSO PARA PREPARAR UM PRODUTO BÍOSSINTÉTICO DIFERENTE DE LISINA, E, USO DE UMA UNIDADE DE EXPRESSÃO**

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2004 DE 10 2004 061 846.1

(73) Titular(es): Basf Aktiengesellschaft

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

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2005013809 de 21/12/2005

(87) Publicação Internacional: WO 2006/069711 de 06/07/2006

(57) Resumo: UNIDADE DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE COMPREENDENDO PROMOTOR MÚLTIPLO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR, MICROORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO, PROCESSO PARA PREPARAR UM PRODUTO BÍOSSINTÉTICO DIFERENTE DE LISINA, E, USO DE UMA UNIDADE DE EXPRESSÃO. A invenção diz respeito a promotores múltiplos e unidades de expressão de gene, ao uso destes para regular a transcrição e expressão de gene, aos cassetes de expressão contendo os ditos promotores múltiplos ou unidades de expressão, aos vetores contendo os ditos cassetes de expressão, aos microorganismos geneticamente modificados contendo os ditos vetores e/ou as ditas unidades de expressão e aos métodos para preparar produtos bÍOSSINTÉTICOS pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados.



“UNIDADE DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE COMPREENDENDO
PROMOTOR MÚLTIPLO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR,
MICROORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO, PROCESSO
PARA PREPARAR UM PRODUTO BIOSSINTÉTICO DIFERENTE DE
5 LISINA, E, USO DE UMA UNIDADE DE EXPRESSÃO”

Dividido do PI0519165-3, depositado em 21/12/2005

A presente invenção diz respeito a promotores múltiplos e às
unidades de expressão que os compreendem; ao uso destes para regular a
transcrição e expressão de genes; aos cassetes de expressão que compreendem
10 promotores múltiplos ou unidades de expressão deste tipo; aos vetores que
compreendem tais cassetes de expressão; aos microorganismos geneticamente
modificados que compreendem vetores e/ou unidades de expressão deste tipo;
e aos processos para preparar produtos biossintéticos pelo cultivo dos ditos
microorganismos geneticamente modificados.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Vários produtos biossintéticos são produzidos em células por
intermédio de processos metabólicos naturais e são usados em muitos ramos
da indústria, que incluem as indústrias de gêneros alimentícios, alimentos para
animais, cosméticos, ração, alimentícias e farmacêuticas. Estas substâncias,
20 que são resumidamente aludidos como produtos químicos finos/proteínas,
compreendem, *inter alia*, ácidos orgânicos, tanto aminoácidos
proteinogênicos e não proteinogênicos, nucleotídeos e nucleosídeos, lipídeos
e ácidos graxos, dióis, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas e co-
fatores e também proteínas e enzimas. Estes são mais convenientemente
25 produzidos em uma larga escala pelo cultivo de cepas bacterianas ou outros
microorganismos que foram desenvolvidos de modo a produzir e secretar
grandes quantidades da substância desejada em cada caso. Organismos
particularmente adequados para este propósito são bactérias corineformes,
bactérias Gram-positivas não patogênicas.

É conhecido que os aminoácidos podem ser preparados pela fermentação de cepas de bactérias corineformes, em particular *Corynebacterium glutamicum*. Devido à enorme importância, trabalho contínuo é realizado na melhora dos processos de produção. As melhorias do processo podem estar relacionadas com as medidas técnicas de fermentação tais como, por exemplo, agitação e fornecimento de oxigênio ou à composição dos meios nutrientes, tais como, por exemplo, a concentração de açúcar durante a fermentação ou ao trabalho para se obter o produto, por exemplo pela cromatografia de troca iônica ou ainda pela secagem por pulverização ou às propriedades de desempenho intrínsecas do próprio microorganismo.

Métodos de tecnologia de DNA recombinante têm sido igualmente utilizados por alguns anos para melhorar as cepas de *Corynebacterium* produtoras de produtos químicos finos/proteínas, pela amplificação de genes individuais e estudando o efeito sobre a produção de produtos químicos finos/proteínas.

Outros modos de desenvolver um processo para produzir produtos químicos finos ou proteínas ou de aumentar ou melhorar a produtividade de um processo já existente para preparar produtos químicos finos ou proteínas compreendem aumentar ou alterar a expressão de um ou mais genes e/ou influenciar a tradução de um mRNA por via de seqüências de polinucleotídeo adequadas. Neste contexto, a influencia pode compreender aumentar, reduzir ou então outros parâmetros da expressão de genes, tais como os padrões de expressão relacionados com o tempo.

Vários componentes de seqüências reguladoras bacterianas são conhecidos pelo técnico habilitado. Uma distinção é feita entre os sítios de ligação de reguladores, também conhecidos como operadores, os sítios de ligação de holoenzimas da RNA polimerase, também conhecido como regiões -35 e -10 e o sítio de ligação de 16S-RNA ribossômico, também conhecido

como sítio de ligação ribossômico (RBS) ou então sequência de Shine-Dalgarno.

A composição da sequência de polinucleotídeo da sequência de Shine-Dalgarno e a sequência das bases, mas também a distância de uma
5 sequência de polinucleotídeo presente na sequência de Shine-Dalgarno em relação ao códon de partida são descritos na literatura (*E. coli* e *S. typhimurium*, Neidhardt F. C. 1995 ASM Press) como tendo uma influência substancial sobre a taxa de início de tradução.

As seqüências de ácido nucleico tendo atividade promotora
10 pode influenciar a formação de mRNA em diferentes modos. Os promotores cujas atividades são independentes da fase de crescimento fisiológico do organismo são aludidos como constitutivos. Outros promotores por sua vez respondem aos estímulos químicos assim como aos físicos externos, tais como oxigênio, metabólitos, calor, pH, etc. Outros por sua vez demonstram
15 uma dependência forte da sua atividade em diferentes fases de crescimento. Os exemplos de promotores que exibem uma atividade particularmente pronunciada durante a fase de crescimento exponencial de microorganismos ou então exatamente na fase estacionária do crescimento microbiano, são descritos na literatura. Ambas as características de promotores podem ter uma
20 influência benéfica sobre a produtividade para a produção de produtos químicos finos e proteínas, dependendo do caminho metabólico.

Estas seqüências de nucleotídeo que podem ser utilizadas para aumentar ou atenuar a expressão de gene já foram isoladas em espécies de *Corynebacterium*. Estes promotores regulados podem aumentar ou reduzir a
25 taxa na qual um gene é transcrito, como uma função das condições internas e/ou externas da célula. Em alguns casos, a presença de um fator particular, conhecido como indutor, pode estimular a taxa de transcrição do promotor. Indutores podem influenciar a transcrição do promotor diretamente ou então indiretamente. Outra classe de fatores, conhecidos como supressores, é capaz

de reduzir ou então inibir a transcrição do promotor. Como indutores, supressores também podem atuar direta ou indiretamente. Entretanto, promotores termicamente regulados também são conhecidos. Assim, uma elevação da temperatura de cultivo acima da temperatura de cultivo normal da célula pode aumentar ou então atenuar o nível de transcrição de tais promotores.

Um número pequeno de promotores de *C. glutamicum* foram descritos até agora. O promotor do gene da malato sintase de *C. glutamicum* foi descrito na DE-A-44 40 118. Este promotor foi colocado a montante de um gene estrutural que codifica uma proteína. Depois da transformação de uma tal construção em uma bactéria corineforme, a expressão do gene estrutural a jusante do promotor é regulada. A expressão do gene estrutural é induzida assim que um indutor correspondente é adicionado ao meio.

Reinscheid *et al.*, Microbiology 145: 503 (1999), descreveram uma fusão transcricional entre o promotor pta-ack de *C. glutamicum* e um gene repórter (cloranfenicol acetiltransferase). As células de *C. glutamicum* contendo uma tal fusão transcricional exibiram expressão aumentada do gene repórter quando cultivadas em meio contendo acetato. Por comparação, o cultivo de células transformadas em glicose não mostrou nenhuma expressão aumentada do dito gene repórter.

Patek *et al.*, Microbiology 142: 1297 (1996), descrevem algumas seqüências de DNA de *C. glutamicum* que são capazes de realçar a expressão de um gene repórter em células de *C. glutamicum*. Estas seqüências foram comparadas entre si de modo a definir as seqüências de consenso para os promotores de *C. glutamicum*.

Outras seqüências de DNA de *C. glutamicum* que podem ser utilizadas para regular a expressão de gene foram descritas na WO 02/40679. Estes polinucleotídeos isolados são unidades de expressão de *Corynebacterium glutamicum*, que podem ser utilizadas para aumentar ou

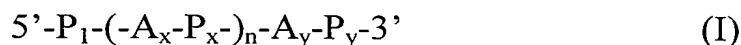
então para reduzir a expressão de gene. Esta publicação impressa além disso descreve plasmídeos recombinantes nos quais as ditas unidades de expressão de *Corynebacterium glutamicum* estão associadas com genes heterólogos. O método aqui descrito, de fundir um promotor de *Corynebacterium glutamicum* a um gene heterólogo, pode ser utilizado, *inter alia*, para regular os genes da biossíntese de aminoácido.

Os pedidos de patente não previamente publicados, mais velhos DE-A-103 59 594, DE-A-103 59 595, DE-A-103 59 660 e DE-A-10 2004 035 065 divulgaram promotores únicos especiais de *C. glutamicum*.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção foi fundamentada no objetivo de fabricar outras seqüências reguladoras de ácido nucleico disponíveis, em particular construções promotoras e/ou unidades de expressão tendo propriedades vantajosas, por exemplo atividade transcricional e/ou atividade traducional aumentadas ou alteradas, em comparação com o promotor de partida.

O objetivo foi alcançado de acordo com a invenção pelo fornecimento de uma unidade de expressão que compreende promotor múltiplo, compreendendo, na direção 5'-3', um módulo de seqüência da seguinte fórmula I:



onde

n é um número inteiro de 0 a 10,

A_x e A_y são idênticos ou diferentes e são uma ligação química ou uma seqüência ligadora de ácido nucleico;

P_1 , P_x e P_y codificam seqüências promotoras idênticas ou diferentes que compreendem pelo menos uma região de ligação da RNA polimerase tal como, por exemplo, a região de núcleo; e pelo menos P_y compreende uma seção de seqüência de terminal 3' que medeia a ligação de ribossoma. P_1 e individual ou todo P_x também podem ter, independentemente

um do outro, uma seção de seqüência deste tipo, que medeia a ligação de ribossoma.

De acordo com um forma de realização, P_1 , P_x e P_y são derivados de organismos eucarióticos ou, em particular, procarióticos idênticos ou diferentes. Os promotores artificiais também são utilizáveis.

De acordo com uma forma de realização preferida, P_1 , P_x e P_y são em cada caso derivados de uma seqüência contígua de 35 a 500 resíduos de nucleotídeo, preferivelmente de 35 a 300 resíduos de nucleotídeo, mais preferivelmente de 35 a 210 resíduos de nucleotídeo e de modo muito particularmente preferível de 35 a 100 resíduos de nucleotídeo, seqüência esta que está localizada 5' a montante da seqüência codificadora para uma proteína, por exemplo uma proteína envolvida em um caminho biossintético do organismo, no genoma do dito organismo.

De acordo com outra forma de realização, P_1 , P_x e P_y da unidade de expressão são derivados de uma bactéria corineforme.

De acordo com uma forma de realização preferida, P_1 , P_x e P_y da unidade de expressão são, independentemente um do outro, selecionados dentre as seqüências promotoras para a seqüência codificadora de uma proteína com alta abundância em um organismo eucariótico ou procariótico, em particular em uma bactéria corineforme, tais como, por exemplo, em um dos gêneros *Corynebacterium* ou *Brevibacterium*, por exemplo uma espécie ou uma cepa de acordo com a lista na Tabela 3.

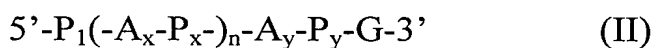
Além disso, individual ou todas destas seqüências promotoras podem ser selecionadas dentre as seqüências promotoras para a seqüência codificadora de uma proteína listada na Tabela 1 e envolvida na biossíntese de aminoácido de um organismo. Pelo menos um dos promotores da unidade de expressão de acordo com a invenção, neste contexto, deve ter entretanto alta abundância como aqui definido.

De acordo com outra forma de realização preferida, P_1 , P_x e P_y

da unidade de expressão são, independentemente um do outro, selecionados dentre as seqüências de nucleotídeo representadas na figura 1 ou, como será explicado mais tarde em mais detalhes, são derivados da SEQ ID NO: 1 (pGRO), SEQ ID NO: 2 (pEFTs), SEQ ID NO: 3 (pEFTu) e SEQ ID NO: 4 (pSOD).

De acordo com outra forma de realização, P_1 , P_x e P_y da unidade de expressão, independentemente um do outro, são selecionados dentre promotores fortes, constitutivos ou reguláveis.

Em um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um cassete de expressão, que compreende, na direção 5'-3', um módulo de seqüência da seguinte fórmula II:



onde

n , A_x , A_y , P_x e P_y são como definidos acima, e

G é pelo menos uma seqüência codificadora de ácido nucleico que é funcional ou operativamente ligado à seqüência reguladora a montante 5'.

De acordo com uma forma de realização preferida do cassete de expressão, G é selecionado dentre

a) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos,

b) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de nucleotídeos e nucleosídeos,

c) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de ácidos orgânicos,

d) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de lipídeos e ácidos graxos,

e) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de dióis,

f) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de carboidratos,

g) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de compostos aromáticos,

5 h) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de vitaminas,

i) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de co-fatores,

10 j) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de enzimas, e

k) ácidos nucleicos que codificam uma proteína do metabolismo central.

De acordo com uma forma de realização particularmente preferida do cassete de expressão, G é selecionado dentre ácidos nucleicos
 15 que codificam proteínas do caminho biossintético de aminoácidos, selecionados dentre aspartato quinase, aspartato semialdeído desidrogenase, diaminopimelato desidrogenase, diaminopimelato descarboxilase, diidrodipicolinato sintetase, diidrodipicolinato redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase, piruvato carboxilase,
 20 triosefosfato isomerase, regulador transcricional LuxR, regulador transcricional LysR1, regulador transcricional LysR2, malato-quinona oxidorreductase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, transcetolase, transaldolase, homosserina O-acetiltransferase, cistationina gama-sintase, cistationina beta-liase, serina
 25 hidroximetiltransferase, O-acetil-homosserina sulfidrilase, metilenotetraidrofoliato redutase, fosfosserina aminotransferase, fosfosserina fosfatase, serina acetiltransferase, homosserina desidrogenase, homosserina quinase, treonina sintase, veículo exportador de treonina, treonina desidratase, piruvato oxidase, exportador de lisina, biotina ligase, cisteína sintase I,

cisteína sintase II, metionina sintase dependente da coenzima B12, atividade da metionina sintase independente da coenzima B12, subunidades 1 e 2 da sulfato adenililtransferase, fosfoadenosina fosfossulfato redutase, ferredoxina sulfito redutase, ferredoxina NADP redutase, 3-fosfoglicerato desidrogenase, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginil-tRNA sintetase, fosfoenolpiruvato carboxilase, proteína do efluxo de treonina, serina hidroximetiltransferase, frutose 1,6-bisfosfatase, proteína da redução de sulfato RXA077, proteína de redução de sulfato RXA248, proteína de redução de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofrutoquinase e 6-fosfofrutoquinase, tetraidropicolinato succinilase, succinil aminocetopimelato aminotransferase, succinil diaminopimelato dessuccinilase, diaminopimelato epimerase, 6-fosfoglucanato desidrogenase, glicose fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, aspartato transaminase, enzima de malato.

Em um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um vetor que compreende pelo menos um dos cassetes de expressão supracitados.

Também de acordo com outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um microorganismo geneticamente modificado que foi transformado com pelo menos um dos vetores supracitados ou que compreende pelo menos um dos cassetes de expressão supracitados, preferivelmente em uma forma integrada.

De acordo com uma forma de realização, no geral o organismo modificado é derivado de bactérias corineformes.

De acordo com uma forma de realização preferida, o organismo geneticamente modificado é derivado de bactérias do gênero *Corynebacterium* ou *Brevibacterium*.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um processo para preparar um produto biossintético, que compreende cultivar qualquer um dos microorganismos geneticamente

modificados supracitados e isolar o produto desejado da cultura.

De acordo com uma forma de realização do processo, o produto biossintético é selecionado dentre ácidos orgânicos, proteínas, nucleotídeos e nucleosídeos, aminoácidos tanto proteinogênicos quanto não proteinogênicos, lipídeos e ácidos graxos, dióis, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas e co-fatores, enzimas e proteínas. Os produtos biossintéticos muito particularmente preferidos são lisina, metionina, treonina e trealose.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito ao uso de uma unidade de expressão da invenção para regular uma biossíntese de produto.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 representa seqüências específicas para quatro promotores, que foram usados para preparar os promotores múltiplos descritos nas formas de realização exemplares. As seqüências promotoras para pEFTu (Figura 1A); para o promotor pGRO (Figura 1 B), para o promotor pEFTs (Figura 1C) e para o promotor pSOD (Figura 1D) são mostrados. Duas seqüências são indicadas para cada promotor, o mais longo dos quais (seqüência de topo) em cada caso indicando a seqüência promotora completa que inclui o sítio de ligação ribossômico (RBS), impresso no tipo **negrito** e em *itálicos*. No caso de um arranjo de terminal 3' do promotor particular na construção de promotor múltiplo da invenção, preferência é dada ao uso em cada caso da seqüência de nucleotídeo mais longa (que inclui RBS). As seqüências promotoras 5' a montante da unidade promotora de terminal 3' não compreendem nenhum RBS e foram usadas na seqüência de ácido nucleico truncada indicada em cada caso na segunda posição (sem RBS). As seqüências promotoras mais curtas também podem carecer, se apropriado, das seqüências parciais de terminal 3' indicadas em letras maiúsculas e tipo **negrito**. As “regiões -10” potenciais estão sublinhadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições Gerais:

Um “produto biossintético” significa para os propósitos da invenção aqueles que são produzidos por intermédio de processos metabólicos naturais (caminhos biossintéticos) em células. Estes são usados em muitos modos diferentes, em particular nos gêneros alimentícios, alimentos para animais, cosméticos, indústrias de ração, alimentícias e farmacêuticas industriais. Estas substâncias que são resumidamente aludidas como produtos químicos finos/proteínas compreendem, *inter alia*, ácidos orgânicos, aminoácidos tanto proteinogênicos quanto não proteinogênicos, nucleotídeos e nucleosídeos, lipídeos e ácidos graxos, dióis, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas e co-fatores e também proteínas e enzimas.

Um “promotor”, um “ácido nucleico com atividade promotora” ou uma “seqüência promotora” significam de acordo com a invenção um ácido nucleico que esteja funcionalmente ligado a um ácido nucleico a ser transcrito e que regula a transcrição do dito ácido nucleico.

A menos que “promotores únicos” sejam expressamente aludidos, o termo “promotor” compreende de acordo com a invenção e dependendo do contexto também o arranjo seqüencial de mais do que uma seqüência de ácido nucleico (isto é, “promotores múltiplos”) cada um dos quais, quando funcionalmente ligado a um ácido nucleico a ser transcrito, pode ser capaz de regular a transcrição do último.

O termo “promotor único” conseqüentemente refere-se a uma única seqüência de ácido nucleico que é capaz de regular a transcrição de um ácido nucleico a ser transcrito e que, quando funcionalmente ligada a um ácido nucleico a ser transcrito, pode transcrever o último.

No caso de “promotores múltiplos”, pelo menos duas seqüências de ácido nucleico idênticas ou diferentes cada uma das quais, quando funcionalmente ligada a um ácido nucleico a ser transcrito, pode ser

capaz de regular a transcrição do último (promotores únicos) são sequencialmente ligadas em um tal modo que um início transcricional opcionalmente de uma das ditas seqüências de ácido nucleico pode produzir um transcrito contendo o dito ácido nucleico a ser transcrito. Neste contexto, é possível para as outras seqüências sem função promotora, por exemplo um ligador que tenha, por exemplo, um ou mais sítios de clivagem de restrição, a ser inserido em cada caso entre dois promotores únicos. Opcionalmente, em cada caso dois promotores únicos também podem estar ligados diretamente entre si. Os ditos promotores múltiplos preferivelmente contêm apenas um sítio de ligação ribossômico (RBS), em particular na região do término 3' do promotor.

As seqüências promotoras para a seqüência codificadora de uma proteína com “alta abundância” significam em particular “promotores fortes”. Se é intencionado utilizar promotores múltiplos de modo a realçar os genes, preferência é dada a combinar em uma maneira adequada tais promotores fortes. Os promotores fortes regulam a transcrição de genes de modo que o último seja mais freqüentemente lido pela RNA polimerase do que a maioria dos genes do organismo. Na maioria dos casos, a presença de um promotor forte resulta em uma grande quantidade de transcrito também estando presente na célula. Quando a porcentagem do dito transcrito é superior em comparação com os outros transcritos celulares, isto é aludido como um “transcrito abundante”. Em bactérias, a quantidade de transcrito e a quantidade da proteína correspondente deste modo codificada usualmente estão correlacionadas, isto é, “transcritos abundantes” também resultam em “proteínas abundantes” na maioria das vezes. Um método que possibilita “promotores fortes” a ser identificado por intermédio da abundância de proteínas é descrito abaixo por via de exemplo. Detalhes do procedimento metódico e outras referências podem ser encontrados, por exemplo, em Proteomics in Practice - A Laboratory Manual of Proteome Analysis

(Autores: R. Westermeier, T. Naven; Editor: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002). As células bacterianas são rompidas e as proteínas do extrato celular são fracionados por meio da eletroforese em gel 2D. As proteínas são depois tingidas pelos métodos comuns tais como, por exemplo, tingimento com

5 Coomassie, prata ou pigmento fluorescente. O tingimento excessivo das proteínas deve ser evitado aqui de modo a possibilitar que as manchas de proteína individuais sejam quantificadas mais tarde. Subseqüentemente, o gel é escaneado e a imagem obtida é analisada com a ajuda de software adequado (por exemplo, Melanie, Amersham Biosciences). Para este propósito, todas as

10 manchas detectáveis são identificadas primeiro e o volume de mancha é determinado. A soma de todos os volumes de mancha corresponde, em uma primeira aproximação, à proteína total. As manchas que têm volumes de mancha particularmente grandes podem ser depois selecionadas com a ajuda do software de análise de imagem. Por exemplo, as manchas com volumes

15 que ocupam mais do que 0,1 % do volume de mancha total pode ser aludido como abundante. Subseqüentemente, as manchas contendo proteínas particularmente abundante são cortadas do gel. Normalmente, a proteína presente na fatia de gel é depois proteoliticamente digerida (por exemplo, com tripsina) e a massa molar dos peptídeos resultantes é determinada, por

20 exemplo com a ajuda de MALDI-ToF MS (ionização de dessorção a laser auxiliada por matriz - Espectrometria de Massa em Tempo de Vôo). Com base na massa molar de alguns dos peptídeos trípticos da proteína, a proteína correspondente pode ser depois identificada em pesquisas de base de dados. Isto é possível em particular se o genoma do organismo a ser estudado foi

25 seqüenciado, como é o caso para *C. glutamicum*, *E. coli* e muitas outras bactérias. A ORF (matriz de leitura aberta) que codifica as ditas proteínas pode ser depois determinada com base na identidade da dita proteína. Em bactérias, os promotores que regulam o dito gene são usualmente localizados imediatamente a montante do códon de partida. Portanto, os promotores

“fortes” freqüentemente também estão presentes em uma região de aprox. 200 nucleotídeos a montante do códon de partida de proteínas “abundantes”.

Promotores “artificiais” para os propósitos da invenção compreendem em particular aquelas seqüências que não têm nenhuma
5 atividade transcricional *in situ* e que são transcricionalmente ativos em um outro contexto de seqüência, tais como, em particular, no contexto de uma unidade de expressão ou cassete de expressão da invenção.

“Atividade promotora” significa de acordo com a invenção a quantidade de RNA formada pelo promotor em um tempo particular, isto é a
10 taxa de transcrição.

Atividade promotora “específica” significa de acordo com a invenção a quantidade de RNA formada pelo promotor em um tempo particular, para cada promotor.

No caso de uma atividade promotora ou taxa de transcrição
15 “causadas” com respeito a um gene, em comparação com o tipo selvagem, assim, em comparação com o tipo selvagem, a formação de um RNA que não estava presente nesta forma no tipo selvagem é causada.

No caso de uma atividade promotora ou taxa de transcrição
20 “alterada” com respeito a um gene, em comparação com o tipo selvagem, assim, em comparação com o tipo selvagem, a quantidade de RNA formado em um tempo particular é alterada.

“Alterada” neste contexto significa preferivelmente aumentada ou reduzida.

Uma ligação “funcional” ou “operativa” significa neste
25 contexto, por exemplo, o arranjo seqüencial de qualquer um dos ácidos nucleicos da invenção que têm atividade promotora e uma seqüência de ácido nucleico a ser transcrito e, se apropriado, outros elementos reguladores tais como, por exemplo, seqüências de ácido nucleico que garantem a transcrição de ácidos nucleicos, assim como um terminador, por exemplo, de modo que

para cada um dos ditos elementos reguladores a serem capazes de satisfazer a sua função na transcrição da dita seqüência de ácido nucleico. Isto não requer necessariamente uma ligação direta no sentido químico. As seqüências de controle genético tais como, por exemplo, as seqüências realçadoras podem exercer a sua função sobre a seqüência alvo também a partir de posições mais distantes ou ainda de outras moléculas de DNA. Preferência é dada aos arranjos em que a seqüência de ácido nucleico a ser transcrita é posicionada por detrás (isto é na extremidade 3') da seqüência promotora da invenção, de modo que as duas seqüências sejam covalentemente conectadas entre si. A distância entre a seqüência promotora e a seqüência de ácido nucleico a ser transgenicamente expressada é aqui preferivelmente menor do que 200 pares de base, de modo particularmente preferível menos do que 100 pares de base, de modo muito particularmente preferível menos do que 50 pares de base.

A seqüência de um “sítio de ligação ribossômico” ou “sítio de ligação de ribossoma” (RBS) (ou aludido como seqüência de Shine-Dalgarno) de acordo com a presente invenção significa seqüências de polinucleotídeo ricas em A/G que estão localizadas até 30 bases a montante do códon de início de tradução.

“Transcrição” significa de acordo com a invenção o processo que, partindo de um padrão de DNA, produz uma molécula de RNA complementar. Este processo envolve proteínas tais como a RNA polimerase, “fatores sigma” e proteínas reguladoras transcricionais. O RNA sintetizado serve depois como padrão no processo de tradução que depois resulta na proteína biossinteticamente ativa.

Uma “região de núcleo” de um promotor significa de acordo com a invenção uma seqüência contígua de ácido nucleico de cerca de 20 a 80 ou 30 a 60, nucleotídeos, que compreendem pelo menos uma “região -10” potencial. Os exemplos de regiões -10 potenciais são aqui descritos para as seqüências promotoras preferidas individuais; comparar a Figura 1 em

particular. As “regiões -10” também são aludidas como caixas TATA ou seqüências de Pribnow-Schaller. Cada promotor usado deve compreender pelo menos uma destas regiões -10 potenciais, por exemplo 1, 2, 3, 4 ou 5. A região de núcleo está localizada 5’ a montante do RBS e pode estar a uma

5 distância do último de 1 a 200 ou 10 a 150 ou 20 a 100 resíduos de nucleotídeo.

Uma “unidade de expressão” significa de acordo com a invenção um ácido nucleico tendo atividade de expressão, que compreende um promotor múltiplo como aqui definido e que, depois da ligação funcional

10 a um ácido nucleico ou um gene a ser expressado, regula a expressão, isto é a transcrição e tradução, do dito ácido nucleico ou dito gene. Neste contexto, portanto, a dita seqüência de ácido nucleico também é aludida como uma “seqüência de ácido nucleico reguladora”. Além da construção de promotor múltiplo, outros elementos reguladores tais como, por exemplo, realçadores,

15 podem estar presentes.

Um “cassete de expressão” significa de acordo com a invenção uma unidade de expressão que seja funcionalmente ligada ao ácido nucleico a ser expressado ou ao gene a ser expressado. Ao contrário de uma unidade de expressão, um cassete de expressão compreende assim não apenas seqüências

20 de ácido nucleico de transcrição e tradução regulares mas também às seqüências de ácido nucleico que devam ser expressadas como proteína como um resultado da transcrição e tradução.

“Atividade de expressão” significa de acordo com a invenção a quantidade de proteína formada pelo cassete de expressão ou a sua unidade de

25 expressão em um tempo particular, isto é a taxa de expressão.

“Atividade de expressão específica” significa de acordo com a invenção a quantidade de proteína formada pelo cassete de expressão ou a sua unidade de expressão em um tempo particular, para cada unidade de expressão.

No caso de uma “atividade de expressão causada” ou taxa de expressão com respeito a um gene, em comparação com o tipo selvagem, assim, em comparação com o tipo selvagem, a formação de uma proteína que não estava presente nesta forma no tipo selvagem é causada.

5 No caso de uma atividade de expressão ou taxa de expressão “alteradas” com respeito a um gene, em comparação com o tipo selvagem, assim, em comparação com o tipo selvagem, a quantidade de proteína formada em um tempo particular é alterada. “Alterada” neste contexto
10 significa preferivelmente aumentada ou reduzida. Isto pode ocorrer, por exemplo, aumentando-se ou reduzindo-se a atividade específica da unidade de expressão endógena, por exemplo por via de mutação ou por via de estimulação ou inibição. A atividade de expressão ou taxa de expressão alterada além disso pode ser obtida, por exemplo, pela expressão regular de genes no microorganismo pelas unidades de expressão da invenção, os genes
15 sendo heterólogos com respeito às unidades de expressão.

 A “taxa de formação” na qual uma proteína biossinteticamente ativa é produzida é um produto das taxas de transcrição e tradução. Ambas as taxas podem ser influenciadas de acordo com a invenção e assim influenciam a taxa de formação de produtos/produtos químicos finos em um
20 microorganismo.

 O termo “tipo selvagem” significa de acordo com a invenção o microorganismo de partida apropriado e não necessita necessariamente corresponder a um organismo que ocorre naturalmente.

 Dependendo do contexto, o termo “microorganismo” pode
25 significar o microorganismo de partida (tipo selvagem) ou um microorganismo geneticamente modificado da invenção ou ambos.

 Preferivelmente e em particular em casos onde não é possível designar o microorganismo ou o tipo selvagem de modo não ambíguo, “tipo selvagem” para alterar ou causar a atividade promotora ou a taxa de

transcrição, para alterar ou causar a atividade de expressão ou a taxa de expressão e para aumentar o teor de produto biossintético em cada caso significa um “organismo de referência”. Em uma forma de realização preferida, este “organismo de referência” é *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 ou um microorganismo derivado de ATCC 13032 pela mutação específica ou não específica.

Uso é feito em particular de “microorganismos de partida” que já são capazes de produzir o produto desejado (produto químico fino/proteína).

Uma sequência “derivada”, por exemplo uma sequência promotora derivada, significa de acordo com a invenção, se nenhuma outra informação é dada, uma sequência cuja identidade com a sequência de partida é de pelo menos 80 % ou pelo menos 90 %, em particular 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % e 99 %.

“Identidade” entre dois ácidos nucleicos significa a identidade dos nucleotídeos em relação ao comprimento do ácido nucleico inteiro em cada caso, em particular a identidade calculada em comparação com a ajuda do software Vector NTI Suite 7.1 da Informax (USA), que aplica o método Clustal (Higgins D G, Sharp P M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. Abril de 1989; 5(2): 151-1), ajustando os seguintes parâmetros:

Parâmetros de alinhamento múltiplo:

Penalidade de abertura de intervalo 10

Penalidade de extensão de intervalo 10

Faixa de penalidade de separação de intervalo 8

Penalidade de separação de intervalo desligado

% de identidade para a demora de alinhamento 40

Intervalos específicos de resíduo desligado

Intervalo de resíduo hidrofílico desligado

Pesagem de Transição 0

Parâmetro de alinhamento aos pares:

algoritmo FAST ligado

tamanho K-tuple 1

5 penalidade de intervalo 3

tamanho da janela 5

Número de melhores diagonais 5

“Hibridizar” significa a capacidade de um poli- ou oligonucleotídeo para ligar sob condições severas a uma seqüência virtualmente complementar, enquanto que as ligações não específicas entre parceiros não complementares não são formadas sob estas condições. Para este propósito, as seqüências devem ser preferivelmente 90 a 100 % complementares. A propriedade das seqüências complementares serem capazes de ligarem-se especificamente entre si é utilizada, por exemplo, nas Técnicas de Northern ou Southern Blotting ou para a ligação de iniciador na PCR ou RT-PCR.

De acordo com a invenção, a “hibridização” ocorre sob condições severas. As condições de hibridização deste tipo são descritas, por exemplo, em Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., em: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 ou em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Condições de hibridização severas significam em particular:

Incubação a 42° C durante a noite em uma solução que consiste de 50 % de formamida, 5 x SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de trissódio), fosfato de sódio a 50 mM (pH 7,6), 5 x solução de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano e 20 g/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, cisalhado, seguido pela lavagem dos filtros com 0,1 x SSC a 65° C.

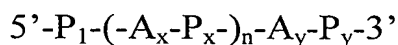
Um “fragmento funcionalmente equivalente” significa fragmentos de seqüências de ácido nucleico tendo atividade promotora que essencialmente têm a mesma atividade promotora específica ou uma alterada, inferior ou superior do que a da seqüência de partida.

5 “Essencialmente idênticos” significa uma atividade promotora específica que tenha pelo menos 50 %, tal como, por exemplo, pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou pelo menos 95 %, da atividade promotora específica da seqüência de partida.

10 II. Unidades de expressão, cassetes de expressão e os seus componentes

a) Unidades de expressão

A presente invenção diz respeito *inter alia* ao fornecimento de uma unidade de expressão que compreende promotor múltiplo, que compreende, na direção de 5’-3’, um módulo de seqüência da seguinte
15 fórmula I:



onde

n é um número inteiro de 0 a 10, tal como por exemplo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6;

20 A_x e A_y são idênticos ou diferentes e são uma ligação química, em particular covalente ou uma quimicamente, em particular seqüência de ácido nucleico ligadora covalentemente integrada;

P_1 , P_x e P_y codificam seqüências promotoras idênticas ou diferentes que compreendem pelo menos uma região de ligação da RNA polimerase tais como, por exemplo, uma região de núcleo; e pelo menos, por
25 exemplo apenas, P_y compreende uma seção de seqüência de terminal 3’ que medeia a ligação de ribossoma.

As seqüências promotoras P_1 , P_x e P_y podem ser derivadas de genes de organismos, que codificam proteínas envolvidas em um caminho

biossintético do dito organismo. As seqüências promotoras aqui são localizadas de 20 a 500 resíduos de nucleotídeo ou de 20 a 300 resíduos de nucleotídeo, por exemplo de 20 a 210 resíduos de nucleotídeo e em particular de 20 a 100 ou 35 a 100 resíduos de nucleotídeo, 5' a montante da seqüência codificadora da proteína particular no genoma do dito organismo.

Os exemplos de seqüências das quais as seqüências promotoras P_1 , P_x e P_y podem ser derivadas são os genes listados na Tabela 1 abaixo.

Os exemplos não limitantes de seqüências promotoras especiais são derivados das seqüências de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4 e a Figura 1, entretanto sem estarem limitados a estes.

Neste contexto, a SEQ ID NO: 1 corresponde à seqüência localizada a montante da região codificadora da GroES Chaperonina (pGRO), a SEQ ID NO: 2 corresponde à seqüência localizada a montante da região codificadora do fator de alongamento de proteína TS (pEFTs), a SEQ ID NO: 3 corresponde à seqüência localizada a montante da região codificadora do fator de alongamento de proteína TU (pEFTu) e a SEQ ID NO: 4 corresponde à seqüência localizada a montante da região codificadora da superóxido dismutase (pSOD), em cada caso de *Corynebacterium glutamicum*. A SEQ. ID.NO. 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4 correspondem às seqüências promotoras do tipo selvagem.

Uma seqüência “derivada” significa de acordo com a invenção uma seqüência que seja pelo menos 80 % ou pelo menos 90 %, tal como 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % e em particular 99 %, idêntica à seqüência de partida. Este grau de identidade aplica-se em particular à “região de núcleo” definida acima do promotor particular. O grau de identidade fora da região de núcleo particular pode ser aqui mais baixa e pode estar na faixa de 0 a 80 %, tal como, por exemplo, de 10 a 80 %, de 20 a

70 %, de 30 a 60 % ou de 40 a 50 %.

As regiões de núcleo utilizáveis estão localizadas, por exemplo para pGRO na faixa de posição de 50 a 80 da SEQ ID NO: 1; para pEFTs na faixa de posição de 130 a 170 da SEQ ID NO:

5 2;

para pEFTu na faixa de posição de 30 a 110 da SEQ ID NO: 3; para pSOD na faixa de posição de 50 a 100 da SEQ ID NO: 4.

As unidades de expressão da invenção contêm em particular duas ou mais seqüências de ácido nucleico tendo atividade

10 promotora,

a) preferivelmente derivada a partir de seqüências idênticas ou diferentes selecionadas dentre a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4; ou outras seqüências promotoras para os genes com abundância comparável ou superior;

15 b) se apropriado, com uma ou mais das ditas seqüências representando uma seqüência derivada pela substituição, inserção, inversão ou deleção ou adição de nucleotídeos, seqüência esta que, em particular está na região de núcleo, pelo menos 80 % idêntica ao nível de ácido nucleico a uma seqüência preferivelmente selecionada dentre as seqüências SEQ ID NO: 1, 2,
20 3 ou 4 ou outras seqüências promotoras para genes com abundância comparável ou superior,

c) ou, se apropriado, com uma ou mais destas seqüências de ácido nucleico presentes hibridizando sob condições severas com uma seqüência que seja complementar a uma das seqüências de ácido nucleico de
25 acordo com as SEQ ID NOs: 1, 2, 3 ou 4 e/ou a outras seqüências promotoras para os genes com abundância comparável ou superior,

d) ou, se apropriado, com uma ou mais destas seqüências de ácido nucleico presentes sendo “fragmentos funcionalmente equivalentes” das seqüências sob a), b) ou c).

Outros promotores naturais que são utilizáveis como um componente de um promotor múltiplo da invenção podem ser facilmente identificados, por exemplo, a partir de vários organismos cuja sequência genômica é conhecida, pela comparação das identidades das sequências de ácido nucleico a partir de bases de dados com as sequências SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4 descritas acima ou de acordo com a Figura 1 ou outras sequências promotoras para os genes com abundância comparável ou superior.

Outros promotores naturais adequados podem ser facilmente identificados a partir de vários organismos cuja sequência genômica não é conhecida aplicando-se as técnicas de hibridização em uma maneira conhecida por si, partindo das sequências de ácido nucleico descritas acima, em particular partindo das sequências SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4 e/ou das sequências promotoras para os genes com abundância comparável ou superior.

Outros promotores naturais adequados também podem ser isolados pelos métodos conhecido pelo técnico habilitado, como são descritos, por exemplo, em Cadenas *et al* (1991) Gene 98, 117-121; Eikmanns *et al*, (1991) Gene 102, 93-98.; Patek *et al* (1996) Microbiology 142, 1297-1309 ou Santamaria *et al* (1987) Gene 56, 199-208. Isto usualmente envolve usando vetores de “sonda promotora” nos quais fragmentos genômicos do genoma em questão são inseridos. A atividade promotora de um fragmento individual pode ser depois determinada no ajuste experimental mencionado medindo-se a atividade de um gene repórter a jusante, por exemplo da cloranfenicol acetiltransferase.

A invenção portanto também compreende a combinação destes promotores que não estão aqui listados por nome. Isto também se aplica à combinação de promotores únicos já conhecidos, como são descritos, por exemplo, em Patek *et al* (2003). J of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova *et al*. (1999) J. Bacteriol. 181, 6188-6191).

A invenção portanto também diz respeito a ácidos nucleicos tendo atividade promotora para a incorporação em uma unidade de expressão da invenção que compreende promotor múltiplo, os ditos ácidos nucleicos tendo atividade promotora que compreendem uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza com a seqüência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4 ou com as seqüências promotoras para os genes com abundância comparável ou superior sob condições severas. Esta seqüência de ácido nucleico compreende pelo menos 10, preferivelmente mais do que 12, 15, 30, 50 ou mais do que 150, nucleotídeos.

As seqüências promotoras artificiais para a incorporação em uma unidade de expressão da invenção que compreende promotor múltiplo podem ser facilmente preparadas partindo das seqüências SEQ ID NO: 1, 2, 3 ou 4 ou de acordo com a Figura 1 e/ou seqüências promotoras para os genes com abundância comparável ou superior por via da variação e mutação artificiais, por exemplo pela adição, substituição, inserção, inversão ou deleção de um ou mais, resíduos de nucleotídeo individuais ou contíguos. (Patek *et al* (2003). *J of Biotechnology* 104, 311-323; Vasicova *et al.* (1999) *J. Bacteriol.* 181, 6188-6191 e referências mencionadas nestas).

Os exemplos adequados de ligação de seções de seqüência de terminação 3' que medeia ribossoma de uma seqüência promotora P_y são RBS de pGRO: GGAGGGA; o RBS de pEFTs: AGGAGGA; o RBS de pEFTu: AGGAGGA; e o RBS de pSOD: GGAGGGA (conforme também a Figura 1, ligada). O RBS ótimo teórico, isto é a seqüência que é 100 % complementar à seqüência anti-Shine-Dalgarno na *C. glutamicum* 16S rRNA, é: 5' GAAAGGAGG 3'. Outras seções de seqüência de RBS adequadas podem ser facilmente identificadas, por exemplo, pela variação e mutação artificiais, por exemplo pela substituição, inserção, inversão, adição ou deleção de nucleotídeos ou por intermédio de comparações de homologia com seqüências promotoras em bases de dados.

Exemplos não limitantes de unidades de expressão da invenção que compreendem promotor múltiplo são selecionados dentre:

e) seqüências que codificam

PeftuPsod, da posição 18 a 390 na SEQ ID NO: 45;

5 PsodPeftu, da posição 18 a 395 na SEQ ID NO: 52;

PgroPsod, da posição 18 a 369 na SEQ ID NO: 55;

PgroPsodPefts, da posição 11 a 538 na SEQ ID NO: 59;

PeftuPsodPefts; da posição 11 a 559 na SEQ ID NO: 60;

ou

10 f) seqüências que são derivadas de seqüências de acordo com

e) pela substituição, inserção, inversão, adição ou deleção de nucleotídeos e que, em comparação com a dita seqüência de partida, são pelo menos 80 % ou pelo menos 90 % idênticos ao nível de ácido nucleico; ou

15 g) seqüências de ácido nucleico que hibridizam com uma seqüência complementar a e) sob condições severas; ou

h) “fragmentos funcionalmente equivalentes” das seqüências supracitadas e), f) e g).

Um “fragmento funcionalmente equivalente”, em particular de acordo com as formas de realização d) e h), significa, para as unidades de expressão, fragmentos que têm essencialmente a mesma atividade de expressão ou uma superior específica como/além da seqüência de partida.

20 “Essencialmente idênticos” significa uma atividade de expressão específica que tem pelo menos 50 %, preferivelmente 60 %, mais preferivelmente 70 %, mais preferivelmente 80 %, mais preferivelmente 90 %
25 %, de modo particularmente preferível 95 %, da atividade de expressão específica da seqüência de partida.

“Fragmentos” significa seqüências parciais das seqüências descritas pela forma de realização a) a h). Os ditos fragmentos preferivelmente têm mais do que 10, mas mais preferivelmente mais do que

12, 15, 30, 50 ou de modo particularmente preferível mais do que 150, nucleotídeos contíguos da sequência de partida.

As unidades de expressão da invenção podem preferivelmente compreender um ou mais dos seguintes elementos genéticos: uma região -10; 5 um início de transcrição, uma região realçadora; e uma região operadora.

Estes elementos genéticos são preferivelmente específicos para as espécies de corinebactérias, especialmente para *Corynebacterium glutamicum*.

Os promotores bacterianos normalmente consistem de três 10 sítios de reconhecimento da RNA polimerase, a saber a região -10, a região -35 e o elemento UP. Estes elementos promotores são altamente conservados na *E. coli*, mas não em *C. glutamicum*. Isto se aplica especialmente à região -35. O último portanto pode ser derivado da sequência apenas freqüentemente incerta, se sob qualquer condição. A região -10, também, é menos altamente 15 conservada do que em organismos que compreendem genomas ricos em AT. As sequências de consenso que previamente foram aqui descritas são TGNGNTA(C/T)AATGG e GNTANAATNG (Patek *et al* (2003), J. of Biotechnology 104, 311-323; Vasicova *et al.* (1999) J. Bacteriol 181, 6188-6191).

20 É bem conhecido que uma alta variabilidade no geral ocorre nas sequências de consenso de bactérias tendo um teor de GC moderado ou alto (tal como, por exemplo, *C. glutamicum*) (Bourn e Babb, 1995, Bashyam *et al*, 1996). Isto se aplica em particular à região -35 que portanto freqüentemente não pode ser prognosticada. Isto está descrito, por exemplo, 25 em Patek *et al* (2003). J of Biotechnology 104, 325-334.

b) Cassetes de expressão

A invenção diz respeito ainda às unidades de expressão da invenção que compreendem promotor múltiplo, funcionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico traduzível. Estas construções que são capazes de

expressar genes, para os propósitos da invenção, também são aludidos como cassetes de expressão.

Uma “ligação funcional” significa neste contexto, por exemplo, o arranjo seqüencial de quaisquer das unidades de expressão da invenção e uma seqüência de ácido nucleico a ser expressada transgenicamente e, se apropriado, outros elementos reguladores tais como um terminador, por exemplo, de modo que cada um dos ditos elementos reguladores sejam capazes de satisfazer uma função na expressão transgênica da dita seqüência de ácido nucleico. Isto não requer necessariamente uma ligação direta no sentido químico. As seqüências de controle genético tais como, por exemplo, seqüências realçadoras podem exercer a sua função na seqüência alvo também a partir de posições mais distantes ou mesmo de outras moléculas de DNA. Preferência é dada aos arranjos em que a seqüência de ácido nucleico a ser expressada transgenicamente é posicionada por detrás (isto é na extremidade 3’) da seqüência da unidade de expressão da invenção, de modo que as duas seqüências sejam covalentemente conectadas entre si. A distância entre a seqüência da unidade de expressão e a seqüência de ácido nucleico a ser expressada transgenicamente é aqui preferivelmente menor do que 200 pares de base, de modo particularmente preferível menor do que 100 pares de base, de modo muito particularmente preferível menor do que 50 pares de base.

Os cassetes de expressão da invenção que compreendem promotor múltiplo tornam possível obter uma atividade de expressão que é diferente em comparação com a atividade de expressão original e assim regular finamente a expressão do gene desejado.

A regulação da expressão de genes no microorganismo pelas unidades de expressão da invenção é preferivelmente obtida pela

- introdução de uma ou mais unidades de expressão da invenção, se apropriado com atividade de expressão específica alterada, no

genoma do microorganismo de modo que um ou mais genes endógenos sejam expressados sob o controle das unidades de expressão da invenção introduzidas; ou

- introdução de uma ou mais construções de ácido nucleico que compreendem uma unidade de expressão da invenção, se apropriado com atividade de expressão específica alterada, e, funcionalmente ligadas, um ou mais ácidos nucleicos a serem expressados, isto é um cassete de expressão, no microorganismo.

Nos cassetes de expressão da invenção, a posição física da unidade de expressão em relação ao gene a ser expressado é escolhida de modo que as ditas unidade de expressão regulem a transcrição e preferivelmente também a tradução, do gene a ser expressado e assim possibilitem a formação de uma ou mais proteínas. “Para possibilitar a formação” aqui inclui aumentar constitutivamente a dita formação, atenuar ou bloquear a dita formação sob condições específicas e/ou aumentar a dita formação sob condições específicas. As “condições” aqui compreendem: (1) adicionar um componente ao meio de cultura, (2) remover um componente do meio de cultura, (3) substituir um componente no meio de cultura com um segundo componente, (4) aumentar a temperatura do meio de cultura, (5) reduzir a temperatura do meio de cultura e (6) regular as condições atmosféricas tais como, por exemplo, concentração de oxigênio ou concentração de nitrogênio, em que o meio de cultura é mantido.

c) Informação geral:

Todos os ácidos nucleicos supracitados tendo atividade promotora e unidades de expressão e cassetes de expressão além disso podem ser preparados em um maneira conhecido por si pela síntese química dos blocos de construção de nucleotídeo, por exemplo pela condensação de fragmento de blocos de construção de ácido nucleico complementares de sobreposição individuais da hélice dupla. A síntese química de

oligonucleotídeos pode ser realizada, por exemplo, em uma maneira conhecida por si usando o método da fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edição, Wiley Press Nova Iorque, pp. 896-897). A montagem de oligonucleotídeos sintéticos e o preenchimento de intervalos com a ajuda do fragmento Klenow de DNA polimerase e reações de ligação e também processos de clonagem geral são descritos em Sambrook *et al.* (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Os métodos e técnicas utilizadas para a presente invenção são conhecidos pelo técnico habilitado treinado em técnicas de DNA microbiológicas e recombinantes. Os métodos e técnicas para cultivar células bacterianas, transportar moléculas de DNA isoladas na célula hospedeira e isolar, clonar e seqüenciar moléculas de ácido nucleico isoladas, etc., são exemplos de tais técnicas e métodos. Estes métodos são descritos em muitos itens da literatura padrão: Davis *et al.*, Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1972); J. H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1992); M. Singer e P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, Califórnia (1991); J. Sambrook, E. F. Fritsch e T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989); P. B. Kaufmann *et al.*, Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Flórida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B. R. Glick e J. E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Flórida (1993); e P. F. Smith-Keary, Molecular Genetics of *Escherichia coli*, The Guilford Press, Nova Iorque, NY (1989).

Todas as moléculas de ácido nucleico da presente invenção estão preferivelmente na forma de uma molécula de ácido nucleico isolada.

Uma molécula de ácido nucleico “isolada” é removida a partir de outras moléculas de ácido nucleico presentes na fonte natural do dito ácido nucleico e pode ser adicionalmente de modo essencial isento de outro material celular ou meio de cultura, se preparado pelas técnicas recombinantes ou isento de precusores químicos ou outros produtos químicos, se quimicamente sintetizada.

A invenção além disso compreende as moléculas de ácido nucleico complementares para as seqüências de nucleotídeo especificamente descritas ou uma seção destas.

As seqüências de nucleotídeo da invenção também possibilitam que sondas e iniciadores sejam gerados que podem ser usados para identificar e/ou clonar seqüências homólogas em outros tipos de célula e microorganismos. As sondas e iniciadores deste tipo usualmente compreendem uma região de seqüência de nucleotídeo que, sob condições severas, hibridiza a pelo menos cerca de 12, preferivelmente pelo menos cerca de 25, tal como, por exemplo, cerca de 40, 50 ou 75, nucleotídeos contínuos de um filamento de sentido de uma seqüência de ácido nucleico da invenção ou de um filamento de anti-sentido correspondente.

A invenção também compreende aquelas seqüências de ácido nucleico que compreendem “mutações silenciosas” ou que foram alteradas em comparação com uma seqüência especificamente mencionado de acordo com o uso do códon de uma fonte ou hospedeiro organismo especiais, assim como variantes que ocorrem naturalmente, por exemplo variantes de junção ou variantes alélicas, destes.

III. Vetores de expressão

A invenção também diz respeito a vetores de expressão que compreendem um cassete de expressão da invenção descrito acima.

Os vetores são bem conhecidos pelo técnico habilitado e podem ser encontrados, por exemplo, em “Vetores de Clonagem” (Pouwels P.

H. *et al.*, eds., Elsevier, Amsterdam-Nova Iorque-Oxford, 1985). Além dos plasmídeos, vetores também significam quaisquer outros vetores conhecidos pelo técnico habilitado, tais como, por exemplo, fagos, transposons, elementos IS, fasmídeos, cosmídeos e DNA linear ou circular. Os ditos
 5 vetores podem ser replicados autonomamente no organismo hospedeiro ou pode ser cromossomicamente replicado.

Os plasmídeos preferidos são de modo particularmente preferível aqueles que são replicados em bactérias corineformes. Numerosos vetores plasmídicos conhecidos tais como, por exemplo, pZ1 (Menkel *et al.*,
 10 Applied and Ambient Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns *et al.*, Gene 102: 93-98 (1991)) ou pHS2-1 (Sonnen *et al.*, Gene 107: 69-74 (1991)) são fundamentados nos plasmídeos críticos pHM1519, pBL1 ou pGA1. Outros vetores plasmídicos tais como, por exemplo, pCLiK5MCS (ver o Exemplo 1) ou aqueles com base em pCG4 (US-A
 15 4.489.160) ou pNG2 (Serwold-Davis *et al.*, FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) ou pAG1 (US-A 5.158.891) podem ser usados do mesmo modo.

Além disso também são adequados aqueles vetores plasmídicos com a ajuda dos quais o processo de amplificação de gene pela
 20 integração no cromossoma pode ser aplicado, como foi descrito, por exemplo, por Remscheid *et al.* (Applied and Ambient Microbiology 60, 126-132 (1994)) para a duplicação e amplificação do operon *hom-thrB*. Neste método, o gene completo é clonado em um vetor plasmídico que pode replicar em um hospedeiro (tipicamente *E. coli*) mas não em *C. glutamicum*. Os exemplos de
 25 vetores adequados são pSUP301 (Simon *et al.*, Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pKl8mob ou pKl9mob (Schafer *et al.*, Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard *et al.*, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf *et al.* 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) ou PBGS8 (Spratt *et al.*, 1986, Gene 41: 337-342). O vetor plasmídico que contém o gene

a ser amplificado é subsequente transferido pela transformação na cepa de *C. glutamicum* desejada. Os métodos de transformação são descritos, por exemplo, em Thierbach *et al.* (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican e Shivan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) e Tauch *et al.* (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)).

IV. Genes e proteínas por meio destes codificadas

A taxa de transcrição e/ou a taxa de tradução de genes em microorganismos, em comparação com o tipo selvagem, podem ser alteradas ou causadas pela regulação da transcrição de genes nos ditos microorganismos pelas unidades de expressão da invenção, os ditos genes sendo heterólogos com respeito às ditas unidades de expressão.

Isto é preferivelmente obtido pela

- introdução de um ou mais ácidos nucleicos da invenção tendo atividade promotora no genoma do microorganismo de modo que um ou mais genes endógenos sejam transcritos sob o controle do dito ácido nucleico introduzido tendo atividade promotora, se apropriado tendo uma atividade promotora específica alterada, ou

- introdução de uma ou mais construções de ácido nucleico contendo um ácido nucleico da invenção tendo atividade promotora e, funcionalmente ligadas, um ou mais ácidos nucleicos exógenos ou endógenos a serem transcritos, no microorganismo.

Se um ou mais genes são introduzidos no genoma de um microorganismo de modo que um ou mais genes introduzidos sejam transcritos sob o controle dos ácidos nucleicos da invenção, a inserção pode ocorrer de modo que o gene ou os genes sejam integrados em regiões codificadoras ou não codificadoras. A inserção preferivelmente ocorre em regiões não codificadoras.

Neste contexto, as construções de ácido nucleico podem ser cromossômica ou extracromossomicamente inseridos. As construções de

ácido nucleico são preferivelmente inseridos cromossomicamente. Uma integração “cromossômica” é a inserção de um fragmento de DNA no cromossoma de uma célula hospedeira.

5 “Endógeno” significa a informação genética tal como, por exemplo, genes, que já estão presentes no genoma do tipo selvagem (como definido acima).

10 “Exógenos” significa informação genética tal como, por exemplo, genes, que não estão presentes no genoma tipo selvagem. Se informação genética exógena, por exemplo a que compreende unidades de expressão de promotor múltiplo da invenção, é introduzida no genoma de uma cepa tipo selvagem, gerando deste modo uma cepa geneticamente modificada, depois esta informação genética é endógena em uma comparação da cepa genética inicialmente gerada com a sua progênie, mas exógenos em uma comparação com a cepa do tipo selvagem original que não compreendeu a dita informação genética.

15 O termo “genes” com respeito à regulação da transcrição pelos ácidos nucleicos da invenção tendo atividade promotora significa preferivelmente ácidos nucleicos que compreendem uma região a ser transcrita, isto é, por exemplo, uma região que regula a tradução, uma região codificadora e, se apropriado, outros elementos reguladores tais como, por exemplo, um terminador.

20 O termo “genes” com respeito à regulação da expressão pelas unidades de expressão da invenção significa preferivelmente ácidos nucleicos que compreendem uma região codificadora e, se apropriado, outros elementos reguladores tais como, por exemplo, um terminador.

25 Uma “região codificadora” significa uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína.

“Heteróloga” com respeito aos ácidos nucleicos tendo atividade promotora e genes significa que os genes usados não são transcritos

no tipo selvagem com a regulação dos ácidos nucleicos da invenção tendo atividade promotora, mas que uma nova ligação funcional que não ocorre no tipo selvagem é produzida e a combinação funcional de ácido nucleico da invenção tendo atividade promotora e específica gene não ocorre no tipo selvagem.

“Heteróloga” com respeito às unidades de expressão e genes significa que os genes usados não são expressados no tipo selvagem com regulação das unidades de expressão da invenção, mas que uma nova ligação funcional que não ocorre no tipo selvagem é produzida e a combinação funcional da unidade de expressão da invenção e gene específico não ocorre no tipo selvagem.

Em uma forma de realização preferida dos processos da invenção descritos acima para alterar ou fazer com que a taxa de transcrição e/ou a taxa de expressão de genes em microorganismos, os genes são selecionados do grupo que consiste de ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de produtos químicos finos, sendo possível para os ditos genes conter outros elementos reguladores, se apropriado.

Em uma forma de realização particularmente preferida dos processos da invenção descritos acima para alterar ou fazer com que a taxa de transcrição e/ou a taxa de expressão de genes em microorganismos, os genes são selecionados dentre:

Ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de nucleotídeos e nucleosídeos, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de ácidos orgânicos, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de lipídeos e ácidos graxos, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de dióis, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de

carboidratos, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de compostos aromáticos, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de vitaminas, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de co-fatores e ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de enzimas, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do metabolismo central, sendo possível para os genes conter outros elementos reguladores, se apropriado.

Em uma forma de realização particularmente preferida, as proteínas são selecionadas do caminho biossintético de aminoácidos, a saber:

10 aspartato quinase, aspartato semialdeído desidrogenase, diaminopimelato desidrogenase, diaminopimelato descarboxilase, diidrodipicolinato sintetase, diidrodipicolinato redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase, piruvato carboxilase, triosefosfato isomerase, regulador transcricional LuxR, regulador transcricional LysR1, regulador transcricional LysR2, malato-quinona oxidorreductase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, transcetolase, transaldolase, homoserina O- acetiltransferase, cistationina gama-sintase, cistationina beta-liase, serina, hidroximetiltransferase, O-acetil-homoserina sulfidrilase, metilenotetra-
20 hidrofoliato redutase, fosfosserina aminotransferase, fosfosserina fosfatase, serina acetiltransferase, homoserina desidrogenase, homoserina quinase, treonina sintase, veículo exportador de treonina, treonina desidratase, piruvato oxidase, exportador de lisina, biotina ligase, cisteína sintase I, cisteína sintase II, metionina sintase dependente da coenzima B12, atividade de metionina
25 sintase independente da coenzima B12, subunidades 1 e 2 da sulfato adenililtransferase, fosfoadenosina fosfossulfato redutase, ferredoxina sulfito redutase, ferredoxina NADP redutase, 3-fosfoglicerato desidrogenase, regulador de RXA00655, regulador de RXN2910, arginil-tRNA sintetase, fosfoenolpiruvato carboxilase, proteína do efluxo de treonina, serina

hidroximetiltransferase, frutose 1,6-bisfosfatase, proteína de redução de sulfato RXA077, proteína de redução de sulfato RXA248, proteína de redução de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofrutoquinase, 6-fosfofrutoquinase, tetraidropicolinato succinilase, succinil aminocetopimelato aminotransferase, succinil diaminopimelato dessuccinilase, diaminopimelato epimerase, 6-fosfogliconato desidrogenase, glicose-fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, aspartato transaminase e enzima de malato.

As proteínas e ácidos nucleicos preferidos que codificam as ditas proteínas são seqüências de proteína e, respectivamente, seqüências de ácido nucleico de origem microbiana, preferivelmente de bactérias do gênero *Corynebacterium* ou *Brevibacterium*, preferivelmente de bactérias corineformes, de modo particularmente preferível de *Corynebacterium glutamicum*.

Os exemplos de seqüências de proteína particularmente preferidas e das seqüências de ácido nucleico correspondentes que codificam as ditas proteínas do caminho biossintético de aminoácidos, o documento que se refere a estas e a sua designação no documento de referência estão listados na Tabela 1:

Tabela 1

Proteína	Ácido nucleico que codifica a proteína	Documento de referência	SEQ ID NO. no documento de referência
Aspartato quinase	ask ou lysC	EP1108790	DNA: 281 Proteína: 3781
Aspartato semialdeído desidrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Proteína: 3831
Diidrodipicolinato sintetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Proteína: 56
Diidrodipicolinato redutase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Proteína: 36
meso-Diaminopimelato D-desidrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Proteína : 6944
Diaminopicolinato descarboxilase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.: 6951
Esportador de lisina	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Tetraidropicolinato	dapD	EP1108790	DNA : 1229

succinilase			Prot : 4729
Succinil aminocetopimelato aminotransferase	dapC	WO 0100843	DNA : 327 Prot: 328
Succinil diaminopimelato dessuccinilase	dapE	WO 0100843	DNA: 31 Prot: 32
Diaminopimelato epimerase	dapF	EP1108790	DNA: 2131 Prot: 5632
Arginil-tRNA sintetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glicose-6-fosfato desidrogenase	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Transcetolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OpcA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
6-Fosfo-glicono-lactonase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2
6-Fosfogliconato desidrogenase		EP1108790	DNA: 1605 Prot: 5105
Glicosefosfato isomerase	gpi	WO 0100844	DNA: 41 Prot.: 42
Malato-quinona oxidorreductase	mgo	WO 0100844	DNA: 569 Proteína: 570
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Fosfoglicerato quinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Triosefosfato isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
1-Fosfofrutoquinase 1	pfk1	WO 0100844	DNA: 55 Proteína: 56
1-Fosfofrutoquinase 2	pfk2	WO 0100844	DNA: 57 Proteína: 58
6-Fosfofrutoquinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Proteína: 4883
6-Fosfofrutoquinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Proteína: 2
Frutose-1,6- bisfosfatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Proteína: 4636
Piruvato oxidase	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Proteína: 86
Fosfoglicerato mutase		WO 0100844	DNA: 49 Prot.: 50
Enolase	eno	WO 0100844	DNA: 71 Prot.: 72
Piruvato quinase	pykA	WO 0100844	DNA: 75 Prot.: 76

Piruvato quinase	pykA	EP1108790	DNA: 3328 Prot.: 6828
Piruvato carboxilase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Aspartato transaminase		EP1108790	DNA: 3226 Prot: 4726 DNA: 3134 Prot.: 6634 DNA: 2861 Prot.: 6361 DNA: 911 Prot.: 4411
PEP-carboxilase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Enzima de Malato	malE	EP1108790	DNA: 3328 Prot: 6828
Biotina lipase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
Homosserina quinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Treonina sintase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Veículo exportador de Treonina	dethrE	WO 0251 231	DNA: 41 Prot.: 42
Proteína do efluxo de treonina	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Treonine desidratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homosserina-O-Acetiltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot: 4227
Cistationina gama-sintase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot: 6991
Cistationina beta-liase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot: 6035
Metionina sintase dependente da Coenzima B12	met	EP 1108790	DNA: 1663 Prot: 5163
O-acetilomosserina Sulfidrilase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot: 4226
Metilenotetraidro-foliato redutase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot: 5879
D-3-Fosfoglicerato desidrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot: 4915
Fosfosserina fosfatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Fosfosserina fosfatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot: 3967
Fosfosserina fosfatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot: 3834
Fosfosserina	serC	WO 0100843	DNA: 151

aminotransferase			Prot.: 152
Serina acetil transferase	cisE	WO 0100843	DNA: 243
			Prot.: 244
Cisteína sintase I	cisK	EP 1108790	DNA: 2817
			Prot.: 6317
Cisteína sintase II	CisM	EP 1108790	DNA: 2338
			Prot.: 5838
Homosserina Desidrogenase	horn	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Metionina sintase independente da Coenzima B12	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756
Serina hidroximetil Transferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Proteína na redução de sulfato	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Proteína na redução de sulfato	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfato adenililtransferase subunidade 1	CisN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfato adenililtransferase subunidade 2	CisD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Fosfoadenosina fosfossulfato redutase	CisH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin sulfito redutase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP redutase	RM076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Regulador transcricional LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Proteína: 298
Regulador transcricional LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Proteína: 4176
Regulador transcricional LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Proteína: 6728
Regulador transcricional LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Proteína: 5700
Regulador RXA00655	RXA655	US2003162267, 2	DNA: 1 Prot.: 2
Regulador RXNO2910	RXN2910	US2003162267, 2	DNA: 5 Prot.: 6

Preferência é dada a selecionar o gene G alvo a ser regulado de acordo com a invenção a partir dos genes listados acima.

Outras seqüências de proteína particularmente preferidas do caminho biossintético de aminoácidos têm em cada caso a seqüência de

aminoácido indicada na Tabela 1 para esta proteína, onde a respectiva proteína tem, em pelo menos uma das posições de aminoácido indicadas na Tabela 2, coluna 2 para esta seqüência de aminoácido, um aminoácido proteinogênico diferente do respectivo aminoácido indicado na Tabela 2, coluna 3 da mesma linhagem. Em uma outra forma de realização preferida, as proteínas têm, em pelo menos uma das posições de aminoácido indicada na Tabela 2, coluna 2 para a seqüência de aminoácido, o aminoácido indicado na Tabela 2, coluna 4 da mesma linhagem. As proteínas indicadas na Tabela 2 são proteínas do caminho biossintético mutadas de aminoácidos, que têm propriedades particularmente vantajosas e são portanto particularmente adequados para expressar os ácidos nucleicos correspondentes através de uma construção promotora da invenção e para produzir aminoácidos. Por exemplo, a mutação T3111 leva à inibição de retroalimentação de *ask* sendo desligada.

Os ácidos nucleicos correspondentes que codificam uma proteína mutada descrita acima a partir da Tabela 2 podem ser preparados pelos métodos convencionais.

Um ponto de partida adequado para preparar as seqüências de ácido nucleico que codificam uma proteína mutada é, por exemplo, o genoma de uma cepa de *Corynebacterium glutamicum* que é obtenível da American Type Culture Collection sob a designação ATCC 13032 ou as seqüências de ácido nucleico aludidas na Tabela 1. Para a retro-tradução da seqüência de aminoácido das proteínas mutadas nas seqüências de ácido nucleico que codificam estas proteínas, é vantajoso usar o uso do códon do organismo no qual a seqüência de ácido nucleico deva ser introduzida ou em que a seqüência de ácido nucleico está presente. Por exemplo, é vantajoso usar o uso do códon de *Corynebacterium glutamicum* for *Corynebacterium glutamicum*. O uso do códon do organismo particular pode ser averiguado em um maneira conhecido por si a partir de bases de dados ou pedidos de patente que descrevem pelo menos uma proteína e um gene que codifica esta proteína

a partir do organismo desejado.

A informação na Tabela 2 deve ser entendida do seguinte modo:

Na coluna 1 “identificação”, uma designação não ambígua para cada seqüência em relação à Tabela 1 é indicada.

Na coluna 2 “AA-POS”, o número respectivo refere-se à posição de aminoácido da seqüência de polipeptídeo correspondente da Tabela 1. Um “26” na coluna “AA-POS” conseqüentemente significa a posição de aminoácido 26 da seqüência de polipeptídeo correspondentemente indicada. A numeração da posição começa em +1 no término N.

Na coluna 3 “AA tipo selvagem”, a respectiva letra designa o aminoácido - representado em código de uma letra - na posição indicada na coluna 2 na cepa do tipo selvagem correspondente da seqüência da Tabela 1.

Na coluna 4 “AA mutante”, a respectiva letra designa o aminoácido - representado em código de uma letra - na posição indicada na coluna 2 na cepa mutante correspondente.

Na coluna 5 “função”, a função fisiológica da seqüência de polipeptídeo correspondente é indicada.

Para uma proteína mutada com uma função particular (coluna 5) e uma seqüência de aminoácido inicial particular (Tabela 1), as colunas 2, 3 e 4 descrevem pelo menos uma mutação e uma pluralidade de mutações para algumas seqüências. Esta pluralidade de mutações sempre se referem à seqüência de aminoácido inicial mais próxima acima em cada caso (Tabela 1). O termo “pelo menos uma das posições de aminoácido” de uma seqüência de aminoácido particular preferivelmente significa pelo menos uma das mutações descritas para esta seqüência de aminoácido nas colunas 2, 3 e 4.

Código de uma letra para aminoácidos proteinogênicos:

A alanina	I isoleucina	Q glutamina
C cisteína	K lisina	R arginina

D aspartato L leucina S serina
 E glutamato M metionina T treonina
 F fenilalanina N asparagina V valina
 G glicina P prolina W triptofano
 5 H histidina Y tirosina

Tabela 2

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5
Identificação	Posição de AA	AA tipo selvagem	AA mutante	Função
ask	317	S	A	aspartato quinase
	311			
	279	A	T	
asd	66	D	G	aspartato-semialdeído desidrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20		F	
dapA	2	S	A	diidro-dipicolinato sintetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	diidro-dipicolinato redutase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	meso-diaminopimelato D-desidrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	diaminopicolinato descarboxilase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	arginil-tRNA sintetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	glicose-6-fosfato desidrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
pycA	7	S	L	piruvato carboxilase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	
	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP carboxilase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	homoserina quinase
	190	T	A	
	133	A		
	138	P	S	
thrC	69	G	R	treonina sintase
	478	T	I	
RXA330	85		M	proteína do efluxo de treonina
	161	F	I	
	195	G	D	
horn	104	V	I	homoserina desidrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	regulador transcricional LysR1
lysR3	142	R	W	regulador transcricional LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	transcetolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	aspartato-1-descarboxilase
	33	G	S	6-fosfogliconolactonase

Microorganismos geneticamente modificados

As unidades de expressão da invenção, os genes descritos acima e as construções de ácido nucleico ou cassetes de expressão descritos acima são introduzidos no microorganismo, em particular em bactérias

corineformes, pelos métodos conhecidos pelo técnico habilitado, tais como a conjugação ou eletroporação (por exemplo, Liebl *et al* (1989) FEMS Microbiology Letters 53, 299-303).

Os cassetes de expressão integrados são preferivelmente selecionados pelo método SacB. O método SacB é conhecido pelo técnico habilitado e é descrito, por exemplo, em Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Pohler A.; Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 e pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*, Gene. Julho de 1994 22; 145(1): 69-73 e Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbial. Junho de 1991; 5(6): 1447-57.

Preferência é dada ao uso de acordo com a invenção como microorganismos de partida aqueles que já produzem o produto variável desejado (produto químico fino/proteína).

A invenção portanto também diz respeito a um microorganismo geneticamente modificado que compreende um cassete de expressão da invenção ou um vetor que compreende o cassete de expressão da invenção.

A presente invenção de modo particularmente preferível diz respeito a microorganismos geneticamente modificados, em particular bactérias corineformes, que compreendem um vetor, em particular um vetor transportador ou vetor plasmídico, que carregue pelo menos um cassete de expressão da invenção.

Os microorganismos ou microorganismos geneticamente modificados preferidos são bactérias, algas, fungos ou leveduras.

Os microorganismos particularmente preferidos são, em particular, bactérias corineformes.

As bactérias corineformes preferidas são bactérias do gênero *Corynebacterium*, em particular das espécies *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* e *Corynebacterium efficiens* ou do gênero *Brevibacterium*, em particular das espécies *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Brevibacterium divaricatum*.

As bactérias particularmente preferidas dos gêneros *Corynebacterium* e *Brevibacterium* são selecionadas do grupo que consiste de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 e *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21608 e também cepas derivada destas, por exemplo pela mutação e seleção clássicas ou pela mutação direta.

A abreviação KFCC significa a Korean Federation of Culture Collection, a abreviação ATCC significa a American type strain culture collection e a abreviação DSM (ou DSMZ) significa a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen).

Outras bactérias particularmente preferidas dos gêneros *Corynebacterium* e *Brevibacterium* são listadas na Tabela 3:

Tabela 3

Bacterium		Deposition number							
Genus	species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							

Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							

Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujikense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							
Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							
Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							

Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

As abreviações têm os seguintes significados:

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

FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japão

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory,
Peoria, ILA, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valência, Espanha

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

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baam, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, Londres, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zeilkulturen,
Braunschweig, Alemanha

Particular preferência é dada aqui aos microorganismos de bactérias do gênero *Corynebacterium*, em particular aquelas que já são capazes de produzir L-lisina, L-metionina e/ou L-treonina. Estas são em particular corinebactérias em que, por exemplo, o gene que codifica uma aspartato quinase (gene ask) é desregulado ou a inibição de retroalimentação foi eliminada ou reduzida. Por exemplo, tais bactérias têm uma mutação no

gene ask, que resulta em uma redução ou eliminação da inibição de retroalimentação, tal como, por exemplo, a mutação T311I.

As unidades de expressão da invenção possibilitam que os caminhos metabólicos para produtos biossintéticos específica nos microorganismos geneticamente modificados da invenção descritos acima seja regulados.

Para este propósito, por exemplo, os caminhos metabólicos que resultam em um produto biossintético específico são realçados causando ou aumentando a taxa de transcrição ou a taxa de expressão de genes deste caminho biossintético em que a quantidade de proteína aumentada resulta em uma atividade total aumentada destas proteínas do caminho biossintético desejado e assim em um fluxo metabólico realçado na direção do produto biossintético desejado.

Além disso, os caminhos metabólicos que divergem a partir de um produto biossintético específico podem ser atenuados pela redução da taxa de transcrição ou taxa de expressão de genes deste caminho biossintético divergente em que a quantidade de proteína reduzida resulta em uma atividade total reduzida destas proteínas do caminho biossintético não desejado e assim adicionalmente em um fluxo metabólico realçado na direção do produto biossintético desejado.

Os microorganismos geneticamente modificados da invenção são capazes, por exemplo, de produzir produtos biossintéticos a partir da glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose, melaços, amido, celulose ou a partir de glicerol e etanol.

A invenção portanto diz respeito a um processo para produzir produtos biossintéticos pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados da invenção.

Dependendo do produto biossintético desejado, a taxa de transcrição ou a taxa de expressão de vários genes devem ser aumentadas ou

reduzidas. É usualmente vantajoso alterar a taxa de transcrição ou a taxa de expressão de uma pluralidade de genes, isto é aumentar a taxa de transcrição ou a taxa de expressão de uma combinação de genes e/ou reduzir a taxa de transcrição ou a taxa de expressão de uma combinação de genes.

5 Nos microorganismos geneticamente modificados da invenção, pelo menos uma taxa de transcrição ou taxa de expressão de um gene alterada, isto é aumentada ou reduzida, pode ser atribuída a um ácido nucleico da invenção tendo atividade promotora ou a uma unidade de expressão da invenção.

10 Outras taxas de transcrição ou taxas de expressão, adicionalmente alteradas, isto é adicionalmente aumentadas ou adicionalmente reduzidas, de outros genes no microorganismo geneticamente modificado podem, mas não precisam, derivar dos ácidos nucleicos da invenção tendo atividade promotora ou das unidades de expressão da
15 invenção.

A invenção portanto além disso diz respeito a um processo para produzir produtos biossintéticos pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados da invenção.

V. Campos de aplicação da invenção

20 As unidades de expressão, cassetes de expressão e vetores da invenção que compreendem promotor múltiplo, por exemplo podem ser usados de modo particularmente vantajoso em processos melhorados para a produção de produtos biossintéticos pela fermentação como descrito abaixo.

25 As unidades de expressão da invenção que compreendem promotor múltiplo ou os cassetes de expressão que os compreendem têm a vantagem particular de possibilitar uma modulação da expressão do gene estrutural funcionalmente ligado.

As unidades de expressão da invenção ou cassetes de expressão que as compreendem podem ser usados para alterar, isto é aumentar

ou reduzir ou para causar a taxa de expressão de genes em microorganismos, em comparação com o tipo selvagem. Isto fornece a possibilidade, no caso de um aumento na taxa de expressão, de maximizar a expressão do gene em questão. Escolhendo-se uma unidade de expressão adequado, entretanto, a
5 expressão também pode estar em uma concentração que esteja abaixo do máximo obtível por uma unidade de expressão diferente, mas que ao mesmo tempo libera o produto de expressão em uma quantidade mais compatível para o microorganismo em expressão. Isto é particularmente vantajoso se concentrações de produto de expressão que são muito altas são
10 tóxicas para o microorganismo em expressão. Por via de seleção dentre as unidades de expressão em cada caso com concentração diferente de expressão, as unidades de expressão da invenção possibilitam assim que a expressão seja finamente regulada a um valor ótimo, em particular para a expressão de longa duração.

15 As unidades de expressão da invenção ou cassetes de expressão que compreendem as ditas unidades de expressão também podem ser usados para regular e realçar a formação de vários produtos biossintéticos tais como, por exemplo, produtos químicos finos, proteínas, em particular aminoácidos, em microorganismos, em particular em espécies de
20 *Corynebacterium*.

A invenção portanto diz respeito ao uso de uma unidade de expressão da invenção que compreende promotor múltiplo para regular uma biossíntese de produto. Aqui, o gene de uma proteína envolvida na regulação de uma biossíntese de produto é colocado sob o controle de uma tal unidade
25 de expressão. A dita biossíntese de produto é influenciada dependendo da taxa de transcrição da unidade de expressão da invenção que compreende promotor múltiplo, selecionada. Alternativamente, o gene de uma proteína envolvida na regulação de uma biossíntese de produto pode ser expressado como constituinte de um cassete de expressão da invenção em um

microorganismo e a dita biossíntese de produto pode ser regulada pela proteína por meio deste expressada. Se a atividade de um promotor múltiplo é mais fraca do que aquela do promotor endógeno, um promotor múltiplo também pode ser utilizado de modo a atenuar especificamente caminhos biossintéticos indesejados.

A taxa de transcrição de uma unidade de expressão da invenção que compreende promotor múltiplo além disso pode ser regulada pela mutação específica de um ou mais promotores individuais que constituem o dito promotor múltiplo. Uma atividade promotora aumentada ou reduzida pode ser obtida substituindo-se nucleotídeos no sítio de ligação dos sítios de ligação da holoenzima da RNA polimerase (conhecidos pelo técnico habilitado também como região -10 e região -35). Além disso, uma influência pode ser exercida pela redução ou extensão da distância entre os sítios de ligação da holoenzima da RNA polimerase descrita pelas deleções de nucleotídeo ou inserções de nucleotídeo; além disso, colocando-se sítios de ligação (também conhecidos como operadores pelo técnico habilitado) para as proteínas reguladoras (conhecidas como repressores e ativadores pelo técnico habilitado) em proximidade espacial aos sítios de ligação da holoenzima de RNA polimerase, de modo que estes reguladores, depois da ligação a uma sequência promotora, atenuem ou realcem a ligação e a atividade transcricional da holoenzima de RNA polimerase ou então submetam a dita ligação e atividade transcricional a uma nova influência reguladora.

A atividade traducional também pode ser influenciada pela mutação da seção de sequência de terminal 3' que medeia a ligação de ribossoma de um promotor único Py dentro da unidade de expressão da invenção que compreende promotor múltiplo.

VI. Produtos biossintéticos e processos de produção preferidos

Os produtos biossintéticos preferidos preparados de acordo com a invenção são produtos químicos finos.

O termo “produto químico fino” é familiar ao técnico habilitado e inclui compostos que são produzidos por um organismo e são usados em vários ramos da indústria tais como, por exemplo mas não restritos à indústria farmacêutica, à agricultura, indústrias de cosméticos, alimento e
5 ração. Estes compostos compreendem ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido láctico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido itacônico e ácido diaminopimélico e aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos, bases de purina e bases de pirimidina, nucleosídeos e nucleotídeos (como descrito por exemplo em Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related
10 compounds, pp. 561-612, em *Biotechnology* vol. 6, Rehm *et al.*, editores, VCH: Weinheim e as referências presentes nestas), lipídeos, ácidos graxos saturados e insaturados (por exemplo, ácido araquidônico), dióis (por exemplo, propanodiol e butanodiol), carboidratos (por exemplo, ácido hialurônico e trealose), compostos aromáticos (por exemplo, aminas
15 aromáticas, vanilina e índigo), vitaminas e co-fatores (como descrito em Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A27, “Vitamins”, pp. 443-613 (1996) VCH: Weinheim e as referências aí presentes; e Ong, A. S., Niki, E. e Packer, L (1995) “Nutrition, Lipids, Health and Disease” Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological
20 Associations in Malaysia e the Society for Free Radical Research - Ásia, realizada em 1-3 de setembro, 1994 em Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), enzimas e todos os outros produtos químicos descritos por Gutcho (1983) no *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 e as referências aí indicadas.

25 Os produtos biossintéticos particularmente preferidos são selecionados do grupo de ácidos orgânicos, proteínas, nucleotídeos e nucleosídeos, aminoácidos tanto proteinogênicos quanto não proteinogênicos, lipídeos e ácidos graxos, dióis, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas e co-fatores, enzimas e proteínas.

Os ácidos orgânicos preferidos são ácido láctico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido itacônico e ácido diaminopimélico.

Os nucleosídeos e nucleotídeos preferidos são descritos por exemplo em Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, pp. 561-612, em *Biotechnology*, vol. 6, Rehm *et al.*, editores VCH: Weinheim e referências aí presentes.

Os produtos biossintéticos preferidos são adicionalmente lipídeos, ácidos graxos saturados e insaturados tais como, por exemplo, ácido araquidônico, dióis tais como, por exemplo, propanodiol e butanodiol, carboidratos tais como, por exemplo, ácido hialurônico e trealose, compostos aromáticos tais como, por exemplo, aminas aromáticas, vanilina e índigo, vitaminas e co-fatores como descrito por exemplo em Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A27, "Vitamins", pp. 443-613 (1996) VCH: Weinheim e as referências aí presentes; e Ong, A. S., Niki, E. e Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, realizada em 1 a 3 de Set. de 1994 em Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), enzimas, policetídeos (Cane *et al.* (1998) *Science* 282: 63-68) e todos os outros produtos químicos descritos por Gutcho (1983) em *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 e as referências aí indicadas.

Os produtos biossintéticos particularmente preferidos são aminoácidos, de modo particularmente preferível aminoácidos essenciais, em particular L-glicina, L-alanina, L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-lisina, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-serina, L-prolina, L-valina, L-isoleucina, L-cisteína, L-tirosina, L-histidina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico e L-treonina, L-homosserina, especialmente L-lisina, L-metionina e L-treonina. Um aminoácido tal como, por exemplo,

lisina, metionina e treonina significa daqui em diante em cada caso tanto a forma L quanto a D do aminoácido, preferivelmente a forma L, isto é por exemplo L-lisina, L-metionina e L-treonina.

5 As seguintes seções descrevem as preparações particularmente preferidas de lisina, metionina e treonina em mais detalhes.

a) Preparação de lisina

10 A invenção em particular diz respeito a um processo para produzir lisina pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados com taxa de expressão aumentada ou causada de pelo menos um gene comparado com o tipo selvagem, onde

- a atividade de expressão no microorganismo de pelo menos um gene endógeno é regulada por uma unidade de expressão da invenção, ou
 - a expressão de pelo menos um gene no microorganismo é causada ou alterada pela introdução no dito microorganismo de um cassete de
- 15 expressão da invenção que compreende o dito gene.

Os genes são selecionados aqui em particular dentre ácidos nucleicos que codificam uma aspartato quinase, ácidos nucleicos que codificam uma aspartato-semialdeído desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma diaminopimelato desidrogenase, ácidos nucleicos que

20 codificam uma diaminopimelato descarboxilase, ácidos nucleicos que codificam uma diidrodipicolinato sintetase, ácidos nucleicos que codificam uma diidrodipicolinato redutase, ácidos nucleicos que codificam uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma 3-fosfoglicerato quinase, ácidos nucleicos que codificam uma piruvato

25 carboxilase, ácidos nucleicos que codificam uma triosefosfato isomerase, ácidos nucleicos que codificam um regulador transcricional LuxR, ácidos nucleicos que codificam um regulador transcricional LysR1, ácidos nucleicos que codificam um regulador transcricional LysR2, ácidos nucleicos que codificam uma malato-quinona oxidoredutase, ácidos nucleicos que

codificam uma glicose-6-fosfato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfogliconato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma transcetolase, ácidos nucleicos que codificam uma transaldolase, ácidos nucleicos que codificam um exportador de lisina, ácidos nucleicos que codificam uma biotina ligase, ácidos nucleicos que codificam uma arginil-tRNA sintetase, ácidos nucleicos que codificam uma fosfoenolpiruvato carboxilase, ácidos nucleicos que codificam uma frutose-1,6-bisfosfatase, ácidos nucleicos que codificam uma proteína OpcA, ácidos nucleicos que codificam uma 1-fosfofrutoquinase, ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfofrutoquinase, ácidos nucleicos que codificam uma tetraidropicolinato succinilase, ácidos nucleicos que codificam uma succinil aminocetopimelato aminotransferase, ácidos nucleicos que codificam uma succinil diaminopimelato dessuccinilase, ácidos nucleicos que codificam uma diaminopimelato epimerase, ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfogliconato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma glicose fosfato isomerase, ácidos nucleicos que codificam uma fosfoglicerato mutase, ácidos nucleicos que codificam uma enolase, ácidos nucleicos que codificam uma piruvato quinase, ácidos nucleicos que codificam uma aspartato transaminase e ácidos nucleicos que codificam uma enzima de malato.

Uma outra forma de realização preferida do processo descrito acima para preparar lisina compreende os microorganismos geneticamente modificados, comparado com o tipo selvagem, tendo adicionalmente uma atividade aumentada, de pelo menos uma das atividades selecionadas dentre a atividade da aspartato quinase, atividade da aspartato semialdeído desidrogenase, atividade da diaminopimelato desidrogenase, atividade da diaminopimelato descarboxilase, atividade da diidrodipicolinato sintetase, atividade da diidrodipicolinato redutase, atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, atividade da 3-fosfoglicerato quinase, atividade da piruvato carboxilase, atividade da triosefosfato isomerase, atividade do regulador

transcricional LuxR, atividade do regulador transcricional LysR1, atividade do regulador transcricional LysR2, atividade da malato-quinona oxidorreductase, atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase, atividade da transcetolase, atividade da transaldolase, atividade do exportador de lisina, atividade da arginil-tRNA sintetase, atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase, atividade da frutose-1,6-bisfosfatase, atividade da proteína OpcA, atividade da 1-fosfofrutoquinase, atividade da 6-fosfofrutoquinase, atividade da biotina ligase e atividade da tetraidropicolinato succinilase, atividade da succinil aminocetopimelato aminotransferase, atividade da succinil diaminopimelato desuccinilase, atividade da diaminopimelato epimerase, atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase, atividade da glicose fosfato isomerase, atividade da fosfoglicerato mutase, atividade da enolase, atividade da piruvato quinase, atividade da aspartato transaminase e atividade da enzima de malato.

Uma outra forma de realização particularmente preferida do processo descrito acima para preparar lisina compreende os microorganismos geneticamente modificados tendo, comparado com o tipo selvagem, adicionalmente uma atividade reduzida, de pelo menos uma das atividades selecionadas do grupo de atividade da treonina desidratase, atividade da homosserina O-acetiltransferase, atividade da O-acetil-homosserina suifidrilase, atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, atividade da piruvato oxidase, atividade da homosserina quinase, atividade da homosserina desidrogenase, atividade do exportador de treonina, atividade da proteína do efluxo de treonina, atividade da asparaginase, atividade da aspartato descarboxilase e atividade da treonina sintase.

b) Preparação de metionina

A invenção ainda diz respeito a um processo para preparar metionina pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados com taxa de expressão aumentada ou causada de pelo menos um gene comparado

com o tipo selvagem, onde

- a atividade de expressão no microorganismo de pelo menos um gene endógeno é regulada por um unidade de expressão da invenção, ou

- a expressão de pelo menos um gene no microorganismo é
5 causado ou alterado pela introdução no dito microorganismo de uma unidade de expressão da invenção que compreende o dito gene.

Os genes são selecionados aqui em particular de ácidos nucleicos que codificam uma aspartato quinase, ácidos nucleicos que codificam uma aspartato semialdeído desidrogenase, ácidos nucleicos que
10 codificam uma homoserina desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma 3-fosfoglicerato quinase, ácidos nucleicos que codificam uma piruvato carboxilase, ácidos nucleicos que codificam uma triosefosfato isomerase, ácidos nucleicos que codificam uma homoserina O-acetiltransferase, ácidos
15 nucleicos que codificam uma cistationina gama-sintase, ácidos nucleicos que codificam uma cistationina beta-liase, ácidos nucleicos que codificam uma serina hidroximetiltransferase, ácidos nucleicos que codificam uma O-acetil-homoserina sulfidrilase, ácidos nucleicos que codificam uma metilenotetraidrofoliato redutase, ácidos nucleicos que codificam uma
20 fosfosserina aminotransferase, ácidos nucleicos que codificam uma fosfosserina fosfatase, ácidos nucleicos que codificam uma serina acetiltransferase, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da cisteína sintase I, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da cisteína sintase II, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da metionina sintase
25 dependente da coenzima B12, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da metionina sintase independente da coenzima B12, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da sulfato adenililtransferase, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da fosfoadenosina fosfossulfato redutase, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da ferredoxina sulfito redutase, ácidos

nucleicos que codificam uma atividade da ferredoxina NADPH redutase, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da ferredoxina, ácidos nucleicos que codificam uma atividade da proteína de redução de sulfato RXA077, ácidos nucleicos que codificam uma proteína de redução de sulfato RXA248, ácidos nucleicos que codificam uma proteína de redução de sulfato RXA247, ácidos nucleicos que codificam um regulador de RXA0655 e ácidos nucleicos que codificam um regulador de RXN2910, ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfogliconato desidrogenase, glicose fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, aspartato transaminase ou enzima de malato.

Uma outra forma de realização preferida do processo descrito acima para preparar metionina compreende os microorganismos geneticamente modificados tendo, comparado com o tipo selvagem, adicionalmente uma atividade aumentada de pelo menos uma das atividades selecionadas do grupo da aspartato quinase, atividade da aspartato semialdeído desidrogenase, atividade da homosserina desidrogenase, atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, atividade da 3-fosfoglicerato quinase, atividade da piruvato carboxilase, atividade da triosefosfato isomerase, atividade da homosserina O-acetiltransferase, atividade da cistationina gama-sintase, atividade da cistationina beta-liase, atividade da serina hidroximetiltransferase, atividade da O-acetil-homosserina sulfidrilase, atividade da metilenotetraidrofoliato redutase, atividade da fosfosserina aminotransferase, atividade da fosfosserina fosfatase, atividade da serina acetiltransferase, atividade da cisteína sintase I, atividade da cisteína sintase II, atividade da metionina sintase dependente da coenzima B12, atividade da metionina sintase independente da coenzima B12, atividade da sulfato adenililtransferase, atividade da fosfoadenosina fosfossulfato redutase, atividade da ferredoxina sulfito redutase, atividade da ferredoxina NADPH redutase, atividade da ferredoxina, atividade da atividade de uma proteína de

redução de sulfato RXA077, atividade de uma proteína de redução de sulfato RXA248, atividade de uma proteína de redução de sulfato RXA247, atividade de um regulador de RXA655 e atividade de um regulador de RXN2910, atividade de uma 6-fosfogliconato desidrogenase, atividade de uma glicose fosfato isomerase, atividade de uma fosfoglicerato mutase, atividade de uma enolase, atividade de uma piruvato quinase, atividade de uma aspartato transaminase e atividade da enzima de malato.

Uma outra forma de realização particularmente preferida do método descrito acima para preparar metionina compreende os microorganismos geneticamente modificados tendo, comparado com o tipo selvagem, adicionalmente uma atividade reduzida de pelo menos uma das atividades selecionadas do grupo da homoserina quinase, atividade da treonina desidratase, atividade da treonina sintase, atividade da meso-diaminopimelato D-desidrogenase, atividade da fosfoenol-piruvato carboxiquinase, atividade da piruvato oxidase, atividade da diidro-dipicolinato sintase, atividade da diidro-dipicolinato redutase e atividade da diaminopicolinato descarboxilase.

c) Preparação de treonina

A invenção ainda diz respeito a um processo para preparar treonina pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados com taxa de expressão aumentada ou causada de pelo menos um gene comparado com o tipo selvagem, onde

- a atividade de expressão no microorganismo de pelo menos um gene endógeno é regulada por uma unidade de expressão da invenção, ou
- a expressão de pelo menos um gene no microorganismo é causada ou alterada pela introdução no dito microorganismo de uma unidade de expressão da invenção que compreende o dito gene.

Os genes são selecionados aqui em particular de ácidos nucleicos que codificam uma aspartato quinase, ácidos nucleicos que

codificam uma aspartato-semialdeído desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma 3-fosfoglicerato quinase, ácidos nucleicos que codificam uma piruvato carboxilase, ácidos nucleicos que codificam uma triosefosfato isomerase, ácidos nucleicos que codificam uma homoserina quinase, ácidos nucleicos que codificam uma treonina sintase, ácidos nucleicos que codificam um veículo exportador de treonina, ácidos nucleicos que codificam uma glicose-6-fosfato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam uma transaldolase, ácidos nucleicos que codificam uma transcetolase, ácidos nucleicos que codificam uma malato-quinona oxidoredutase, ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfogliconato desidrogenase, ácidos nucleicos que codificam um exportador de lisina, ácidos nucleicos que codificam uma biotina ligase, ácidos nucleicos que codificam uma fosfoenolpiruvato carboxilase, ácidos nucleicos que codificam uma proteína do efluxo de treonina, ácidos nucleicos que codificam uma frutose-1,6-bisfosfatase, ácidos nucleicos que codificam uma proteína OpcA, ácidos nucleicos que codificam uma 1-fosfofrutoquinase, ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfofrutoquinase e ácidos nucleicos que codificam uma homoserina desidrogenase e ácidos nucleicos que codificam uma 6-fosfogliconato desidrogenase, glicose fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, aspartato transaminase e enzima de malato.

Uma outra forma de realização preferida do processo descrito acima para preparar treonina compreende os microorganismos geneticamente modificados tendo, comparado com o tipo selvagem, adicionalmente uma atividade aumentada de pelo menos uma das atividades selecionadas do grupo de:

atividade da aspartato quinase, atividade da aspartato-semialdeído desidrogenase, atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, atividade da 3-fosfoglicerato quinase, atividade da piruvato

carboxilase, atividade da triosefosfato isomerase, atividade da treonina sintase, atividade da atividade de um veículo exportador de treonina, atividade da transaldolase, atividade da transcetolase, atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, atividade da malato-quinona oxidoredutase, atividade da

5 homosserina quinase, atividade da biotina ligase, atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase, atividade da proteína do efluxo de treonina, atividade da proteína OpcA, atividade da 1-fosfofrutoquinase, atividade da 6-fosfofrutoquinase, atividade da frutose-1,6-bisfosfatase, atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase, homosserina desidrogenase atividade e

10 atividade de uma 6-fosfogliconato desidrogenase, atividade de uma glicose fosfato isomerase, atividade de uma fosfoglicerato mutase, atividade de uma enolase, atividade de uma piruvato quinase, atividade de uma aspartato transaminase e atividade da enzima de malato.

Uma outra forma de realização particularmente preferida do

15 processo descrito acima para preparar treonina compreende os microorganismos geneticamente modificados tendo, comparado com o tipo selvagem, adicionalmente uma atividade reduzida de pelo menos uma das atividades selecionadas do grupo da treonina desidratase, atividade da homosserina O-acetiltransferase, atividade da serina hidroximetiltransferase,

20 atividade da O-acetil-homosserina sulfidrilase, atividade da meso-diaminopimelato D-desidrogenase, atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, atividade da piruvato oxidase, atividade da diidro-dipicolinato sintetase, atividade da diidro-dipicolinato redutase, atividade da asparaginase, atividade da aspartato descarboxilase, atividade do exportador de lisina,

25 atividade da acetolactato sintase, atividade da cetol-ácido reductoisomerase, atividade da cadeia ramificada da aminotransferase, atividade da metionina sintase dependente da coenzima B12, atividade da metionina sintase independente da coenzima B12, atividade da diidróxi-ácido desidratase e atividade da diaminopicolinato descarboxilase.

d) Outra informação sobre a preparação de bioprodutos de acordo com a invenção

Estas atividades aumentadas ou reduzidas adicionais de pelo menos uma das atividades descritas acima podem, mas não necessitam, ser
5 causadas por uma unidade de expressão da invenção ou um cassete de expressão da invenção.

O termo “atividade” de uma proteína significa no caso de enzimas a atividade enzimática da proteína correspondente e no caso de outras proteínas, por exemplo proteínas estruturais ou de transporte, a
10 atividade fisiológica das proteínas.

As enzimas são ordinariamente capazes de converter um substrato em um produto ou catalisar esta etapa de conversão. Conseqüentemente, a “atividade” de uma enzima significa a quantidade de substrato convertido pela enzima ou a quantidade de produto formado, em um
15 tempo particular.

Assim, onde uma atividade é aumentada comparada com o tipo selvagem, a quantidade do substrato convertido pela enzima ou a quantidade de produto formado, em um tempo particular é aumentada comparada com o tipo selvagem.

20 Este aumento na “atividade”, por exemplo, quantidades, para todas as atividades anteriormente descrita e daqui em diante, de pelo menos 1 a 5 %, tal como, por exemplo, pelo menos 20 %, pelo menos 50 %, pelo menos 100 %, pelo menos 300 % ou pelo menos 500 % ou pelo menos 600 % da “atividade do tipo selvagem”.

25 Assim, onde uma atividade é reduzida comparada com o tipo selvagem, a quantidade de substrato convertido pela enzima ou a quantidade de produto formado, em um tempo particular é reduzida comparada com o tipo selvagem.

Uma atividade reduzida preferivelmente significa a supressão

ou bloqueio parcial ou substancialmente completo, com base em vários mecanismos biológicos celulares, da funcionalidade desta enzima em um microorganismo.

5 Uma redução na atividade compreende uma diminuição quantitativa em uma enzima tanto quanto a ausência substancialmente completa da enzima (isto é a falta de detectabilidade da atividade correspondente ou a falta de detectabilidade imunológica da enzima). A atividade no microorganismo é preferivelmente reduzida, comparada com o tipo selvagem, em pelo menos 5 %, tal como em pelo menos 20 %, em pelo
10 menos 50 % ou em cerca de 100 %. “Redução” também significa em particular a ausência completa da atividade correspondente.

A atividade de enzimas particulares em microorganismos geneticamente modificados e no tipo selvagem e assim o aumento ou redução na atividade enzimática pode ser medida pelos métodos conhecidos tais como,
15 por exemplo, ensaios de enzima.

Um aumento adicional das atividades pode ocorrer de vários modos, por exemplo desligando-se os mecanismos reguladores inibidores ao nível de expressão e proteína ou pelo aumento da expressão de gene de ácidos nucleicos que codificam as proteínas descritas acima comparado com o tipo
20 selvagem.

Aumentar a expressão de gene do ácidos nucleicos que codificam as proteínas descritas acima comparado com o tipo selvagem pode do mesmo modo ocorrer de vários modos, por exemplo pela indução do gene pelos ativadores ou, como descrito acima, aumentando-se a atividade
25 promotora ou aumentando-se a atividade de expressão ou pela introdução de um ou mais cópias de gene no microorganismo.

Aumentar a expressão de gene de um ácido nucleico que codifica uma proteína também significa de acordo com a invenção a manipulação da expressão das proteínas endógenas intrínseca ao

microorganismo. Isto pode ser obtido por exemplo, como descrito acima, alterando-se as seqüências promotoras dos genes, introduzindo uma unidade de expressão da invenção para o controle regulador dos genes e alterando as unidades de expressão da invenção introduzidas. Uma tal alteração, que
5 resulta em uma taxa de expressão aumentada do gene, pode ocorrer por exemplo pela deleção ou inserção de seqüências de DNA.

É possível, como descrito acima, alterar a expressão das proteínas endógenas pela aplicação de estímulos exógenos. Isto pode ocorrer através de condições fisiológicas particulares, isto é através da aplicação de
10 substâncias estranhas.

O técnico habilitado pode ter recursos para outros procedimentos diferentes, isoladamente ou em combinação, para se obter um aumento na expressão de gene. Assim, por exemplo, o número de cópia dos genes apropriados pode ser aumentado ou o promotor e a região reguladora ou
15 o sítio de ligação de ribossoma localizado a montante do gene estrutural podem ser mutados. É adicionalmente possível aumentar a expressão durante a produção fermentativa através de promotores indutíveis. Procedimentos para prolongar o período de vida do mRNA do mesmo modo melhora a expressão. A atividade enzimática é do mesmo modo realçada também
20 impedindo-se a degradação da proteína enzimática. Os genes ou construções de gene podem estar presentes em plasmídeos com número de cópia variável ou integrado e amplificado no cromossoma. Também é possível como uma alternativa obter a super expressão dos genes relevantes alterando-se a composição do meio e o controle da cultura.

25 O técnico habilitado pode encontrar orientação sobre isto *inter alia* em Martin *et al.* (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), em Guerrero *et al.* (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya e Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), em Eikmanns *et al.* (Gene 102, 93-98 (1991)), na EP-A 0472869, na USA 4.601.893, em Schwarzer e Pichler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), em

Reinscheid *et al.* (Applied and Ambient Microbiology 60, 126-132 (1994), em LaBarre *et al.* (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), na WO 96/15246, em Malumbres *et al.* (Gene 134, 15-24 (1993)), na JP-A-10-229891, em Jensen e Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), em Makrides (Microbiological Reviews 60: 512-538 (1996) e em livros texto bem conhecidos de genética e biologia molecular.

Pode ser adicionalmente vantajoso para a produção de produtos biossintéticos, especialmente L-lisina, L-metionina e L-treonina, além da expressão ou realce de um gene, eliminar reações colaterais indesejadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", em: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, UK, 1982).

Em uma forma de realização preferida, a expressão de gene de um ácido nucleico que codifica uma das proteínas descritas acima é aumentada pela introdução de pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína correspondente no microorganismo. A introdução do ácido nucleico pode ocorrer cromossômica ou extracromossomicamente, isto é através do aumento do número de cópia no cromossoma e/ou uma cópia do gene em um plasmídeo que replique no microorganismo hospedeiro.

A introdução do ácido nucleico, por exemplo na forma de um cassete de expressão da invenção que compreende o ácido nucleico, preferivelmente ocorre cromossomicamente, em particular pelo método SacB descrito acima. É possível em princípio usar para este propósito qualquer gene que codifique uma das proteínas descritas acima.

No caso de seqüências de ácido nucleico genômicas de fontes eucarióticas que compreendem introns, se o microorganismo hospedeiro é incapaz ou não pode ser feito capaz de expressar as proteínas correspondentes é preferido usar seqüências de ácido nucleico que já tenham sido processadas, tais como os cDNAs correspondentes.

Os exemplos dos genes correspondentes estão listados nas Tabelas 1 e 2.

As atividades descritas acima em microorganismos são preferivelmente reduzidas em pelo menos um dos seguintes métodos:

- 5 • introdução de pelo menos uma seqüência de ácido ribonucleico de sentido para induzir a co-supressão ou de um cassete de expressão que garanta a sua expressão
- introdução de pelo menos um fator de ligação de DNA ou proteína contra um gene, um RNA ou uma proteína correspondentes ou de um
 - 10 cassete de expressão que garanta a sua expressão
 - introdução de pelo menos uma seqüência de ácido nucleico viral que cause a degradação do RNA ou de um cassete de expressão que garanta a sua expressão
 - introdução de pelo menos uma construção para produzir uma
 - 15 perda de of função, tal como, por exemplo, a geração de códons de parada ou mudanças na matriz de leitura, de um gene, por exemplo pela produção de uma inserção, deleção, inversão ou mutação em um gene. É possível e preferido gerar mutantes silenciados pela inserção alvejada no gene alvo desejado através da recombinação homóloga ou introdução de nucleases
 - 20 específicas de seqüência contra o gene alvo.
 - introdução de um promotor com atividade promotora reduzida ou de uma unidade de expressão com atividade de expressão reduzida.
 - introdução de um RNA de anti-sentido que reduza a tradução
 - 25 do RNA de sentido (mRNA).

O técnico habilitado está ciente de que outros processos também podem ser utilizados dentro do escopo da presente invenção para reduzir a sua atividade ou função. Por exemplo, a introdução de uma variante negativa dominante de uma proteína ou de um cassete de expressão que

garanta a sua expressão também pode ser vantajoso.

É além disso possível para cada um destes processos realizar uma redução na quantidade de proteína, quantidade de mRNA e/ou atividade de uma proteína. Um uso combinado também é concebível. Outros métodos são conhecidos pelo técnico habilitado e podem compreender impedir ou suprimir o processamento da proteína, do transporte da proteína ou do seu mRNA, a inibição da ligação de ribossoma, a inibição da junção de RNA, indução de uma enzima de degradação do RNA e/ou inibição do prolongamento ou término da tradução.

VII. Cultivo de microorganismos e isolamento de produtos

No processo da invenção para preparar produtos biossintéticos, a etapa de cultivar os microorganismos geneticamente modificados é preferivelmente seguida por uma isolamento de produtos biossintéticos a partir dos microorganismos e/ou a partir do caldo de fermentação. Estas etapas podem ocorrer ao mesmo tempo e/ou preferivelmente depois da etapa de cultivo.

Os microorganismos geneticamente modificados da invenção podem ser cultivados para produzir produtos biossintéticos, em particular L-lisina, L-metionina e L-treonina, continuamente ou descontinuamente em um processo por batelada (cultivo por batelada) ou no processo de lote alimentado ou lote alimentado repetido. Um resumo de métodos de cultivo conhecidos deve ser encontrado nos livros texto por Chemiel (BioprozelMechnik 1. Einfuhrung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) ou nos livro texto por Storhas (Bioreaktoren and periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

O meio de cultura a ser usado deve satisfazer em uma maneira adequada as demandas das cepas respectivas. Existem descrições de meios de cultura para vários microorganismos no manual "Manual of Methods for

General Bacteriology” da American Society for Bacteriology (Lavarton D.C., USA, 1981).

Estes meios que podem ser utilizados de acordo com a invenção usualmente compreendem uma ou mais fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e/ou elementos traço.

As fontes de carbono preferidas são açúcares tais como mono-, di- ou polissacarídeos. Os exemplos de fontes de carbono muito boas são glicose, frutose, manose, galactose, ribose, sorbose, ribulose, lactose, maltose, sacarose, rafinose, amido ou celulose. Os açúcares podem ser colocados nos meios também por intermédio de compostos complexos tais como melaços ou outros sub-produtos do refino do açúcar. Também pode ser vantajoso adicionar misturas de várias fontes de carbono. Outras fontes de carbono possíveis são óleos e gorduras tais como, por exemplo, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de amendoim e gordura de coco, ácidos graxos tais como, por exemplo, ácido palmítico, ácido esteárico ou ácido linoléico, álcoois tais como, por exemplo, glicerol, metanol ou etanol e ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético ou ácido láctico.

As fontes de nitrogênio são usualmente compostos de nitrogênio orgânicos ou inorgânicos ou materiais contendo estes compostos. Os exemplos de fontes de nitrogênio compreendem gás de amônia ou sais de amônio tais como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio ou nitrato de amônio, nitratos, uréias, aminoácidos ou fontes de nitrogênio complexas tais como o líquido da maceração do milho, farinha de soja, proteína de soja, extrato de levedura, extrato de carne e outros. As fontes de nitrogênio podem ser usadas isoladamente ou como misturas.

Os compostos de sal inorgânico que podem estar presentes nos meios compreendem o sais de cloreto, fosfórico ou sulfato de cálcio, magnésio, sódio, cobalto, molibdênio, potássio, manganês, zinco, cobre e

ferro.

Para preparar produtos químicos finos, especialmente metionina, é possível usar como compostos inorgânicos fontes de enxofre tais como, por exemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetracionatos, tiosulfatos, sulfetos, mas também compostos de enxofre orgânico tais como mercaptanas e tióis.

É possível usar como fonte de fósforo ácido fosfórico, diidrogeno fosfato de potássio ou diidrogeno fosfato de potássio ou os sais contendo sódio correspondentes.

Os agentes queladores podem ser adicionados ao meio de modo a manter os íons metálicos em solução. Os agentes queladores particularmente adequados compreendem diidroxifenóis tais como catecol ou protocatecuato ou ácidos orgânicos tais como ácido cítrico.

Os meios de fermentação utilizados de acordo com a invenção normalmente também compreendem outros fatores de crescimento tais como vitaminas ou promotores do crescimento, que incluem por exemplo biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato e piridoxina. Fatores de crescimento e sais são freqüentemente derivados de componentes complexos dos meios, tais como extrato de levedura, melaços, líquido da maceração do milho e outros. Precursores adequados também podem ser adicionados aos meios de cultura. A composição exata dos compostos nos meios depende enormemente do experimento particular e será decidido individualmente para cada caso específico. A informação sobre a otimização de meios é obtível do livro texto "Applied Microbial. Physiology, A Practical Approach" (editores P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL Press (1997) pp. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Os meios de cultivo também podem ser adquiridos de fornecedores comerciais, tais como o Padrão 1 (Merck) ou BHI (Infusão cperebro-coração, DIFCO) e outros.

Todos os componentes dos meios são esterilizados pelo

aquecimento (20 min a 1,5 bar e 121° C) ou pela filtração esterilizante. Os componentes podem ser esterilizados juntos ou, se necessário, separadamente. Todos os componentes dos meios podem estar presentes no início do cultivo ou opcionalmente ser adicionados continuamente ou por batelada.

5 A temperatura da cultura está normalmente entre 15° C e 45° C, preferivelmente de 25° C a 40° C e pode ser mantida constante ou trocada durante o experimento. O pH do meio deve estar na faixa de 5 a 8,5, preferivelmente em torno de 7,0. O pH para o cultivo pode ser controlado durante o cultivo pela adição de compostos básicos tais como hidróxido de
10 sódio, hidróxido de potássio, amônia ou amônia aquosa ou compostos ácidos tais como ácido fosfórico ou ácido sulfúrico. O desenvolvimento de espuma pode ser controlado pela utilização de antiespumantes tais como, por exemplo, ésteres poliglicólicos de ácido graxo. A estabilidade de plasmídeos pode ser mantida pela adição ao meio de substâncias adequadas com uma
15 ação seletiva, tal como, por exemplo, antibióticos. As condições aeróbicas são mantidas pela introdução de oxigênio ou misturas gasosas contendo oxigênio tal como, por exemplo, ar ambiente na cultura. A temperatura da cultura é normalmente de 20° C a 45° C. A cultura é continuada até que a formação do produto desejado esteja em um máximo. Este objetivo é normalmente
20 atingido dentro de 10 horas a 160 horas.

O teor de matéria seca dos caldos de fermentação obtidos deste modo é normalmente de 7,5 a 25 % em peso.

É adicionalmente vantajoso conduzir também a fermentação com limitação de açúcar pelo menos no final, mas em particular durante pelo
25 menos 30 % do tempo de fermentação. Isto significa que a concentração de açúcar utilizável no meio de fermentação é mantido de 0 a 3 g/l ou é reduzida, durante este tempo.

Os produtos biossintéticos são isolados do caldo de fermentação e/ou dos microorganismos em uma maneira conhecida por si de

acordo com as propriedades físico/químicas do produto biossintético requerido e dos subprodutos biossintéticos.

5 O caldo de fermentação pode ser depois por exemplo processado ainda mais. Dependendo da exigência, a biomassa pode ser removida total ou parcialmente a partir do caldo de fermentação pelos métodos de separação tais como, por exemplo, centrifugação, filtração, decantação ou uma combinação destes métodos ou deixados completamente nele.

10 O caldo de fermentação pode ser depois espessado ou concentrado por métodos conhecidos tais como, por exemplo, com a ajuda de um evaporador rotativo, evaporador de película fina, evaporador de película em queda, pela osmose reversa ou pela nanofiltração. Este caldo de fermentação concentrado pode ser depois trabalhado pela secagem por congelamento, secagem por pulverização, granulação por pulverização ou por
15 outros processos.

Entretanto, também é possível ainda purificar os produtos biossintéticos, especialmente L-lisina, L-metionina e L-treonina. Para este propósito, o caldo contendo produto é submetido, depois da remoção da biomassa, a uma cromatografia usando uma resina adequado, com o produto
20 desejado ou as impurezas que são retidas total ou parcialmente na resina cromatográfica. Estas etapas cromatográficas podem ser repetidas se requerido, usando as mesmas resinas cromatográficas ou diferentes. O técnico habilitado é proficiente na seleção de resinas cromatográficas adequadas e o seu uso mais eficaz. O produto purificado pode ser concentrado pela filtração
25 ou ultrafiltração e ser armazenado a uma temperatura na qual a estabilidade do produto seja um máximo.

Os produtos biossintéticos podem resultar em várias formas, por exemplo na forma de seus sais ou ésteres.

A identidade e pureza do(s) composto(s) isolado(s) pode(m)

ser determinado(s) pelas técnicas da técnica anterior. Estas compreendem a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), métodos espectroscópicos, métodos de tingimento, cromatografia de camada fina, MRS, ensaio de enzima ou ensaios microbiológicos. Estes métodos analíticos são resumidos em: Patek *et al.* (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova *et al.* (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; e Schmidt *et al.* (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) vol. A27, VCH: Weinheim, pp. 89-90, pp. 521-540, pp. 540-547, pp. 559-566, 575-581 e pp. 581-587; Michel, G (1999) Biochemical Pathways: A Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. *et al.* (1987) Applications of HPLC in Biochemistry em: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17.

A invenção é agora descrito em mais detalhes por meio dos seguintes exemplos não limitantes:

Exemplo 1:

Preparação do vetor pCLIK5MCS

Primeiro, a resistência à ampicilina e a origem de replicação do vetor pBR322 foram amplificados com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 5:

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCCGGTGTGA
AATACCGCACAG-3'

SEQ ID NO: 6:

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGGCCTTTAAATTGAAGAC
GAAAGGGCCTCG-3'

À parte das seqüências complementares a pBR322, o iniciador de oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 5 compreende, na direção de 5' a 3', os sítios de clivagem para as endonucleases de restrição SmaI, BamHI, NheI e

AscI e o iniciador de oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 6 compreende, na
 direção de 5' a 3', os sítios de clivagem para as endonucleases de restrição
 XbaI, XhoI, NotI e DraI. A reação de PCR foi realizada por um método
 padrão tal como Innis *et al.* (PCR Protocols. A Guide to Methods and
 5 Applications, Academic Press (1990)) usando a PfuTurbo polimerase
 (Stratagene, La Jolla, USA). O fragmento de DNA obtido, cujo tamanho é de
 aproximadamente 2,1 kb, foi purificado usando o Kit de GFX[®] PCR, DNA
 and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemanha) de
 acordo com as informações do fabricante. As extremidades abruptas do
 10 fragmento de DNA foram ligados entre si usando o Kit de Ligação de DNA
 Rápido (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) de acordo com as
 informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada de acordo
 com métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning.
 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente
 15 XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção para células que abrigam
 plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB Ágar contendo ampicilina (501,1
 g/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico de um clone individual foi isolado usando
 o kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as
 20 informações do fabricante e checado por intermédio de digestões de restrição.
 O plasmídeo obtido deste modo é denotado pCLiK1.

Partindo do plasmídeo pWLT1 (Liebl *et al.*, 1992) como
 padrão para uma reação de PCR, um cassete de resistência à canamicina foi
 amplificado usando os iniciadores de oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 7 e
 25 SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 7:

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGG
 AAGCGGA-3'

SEQ ID NO: 8

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAAGTCCAGCA-3'

À parte das seqüências complementares a pWLT1, iniciador de oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 7 compreende, na direção de 5' para 3', os sítios de clivagem para as endonucleases de restrição XbaI, SmaI, BamHI, NheI e o iniciador de oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 8 compreende, na

5 direção 5' a 3', os sítios de clivagem para as endonucleases de restrição AscI e NheI. A reação de PCR foi realizada pelo método padrão tal como Innis *et al.* (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)), usando PfuTurbo polimerase (Stratagene, La Jolla, USA). O

10 fragmento de DNA obtido, cujo tamanho é de aproximadamente 1,3 kb, foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA e Gel Band Purificação (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. O fragmento de DNA foi cortado pelas endonucleases de restrição XbaI e AscI (New England Biolabs, Beverly, USA) e subsequente

15 mente purificado mais uma vez usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. O vetor pCLiK1 foi igualmente cortado pelas endonucleases de restrição XbaI e AscI e desfosforilado pela fosfatase alcalina (I (Roche

20 Diagnostics, Mannheim)) de acordo com as informações do fabricante. Depois da eletroforese em um gel de agarose a 0,8 % de concentração, o vetor linearizado (aprox. 2,1 kb) foi isolado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este fragmento de vetor foi ligado com o

25 fragmento de PCR cortado com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida

plaqueando-se em LB ágar contendo ampicilina (50 µg/ml) e canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico de um clone individual foi isolado usando o Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as informações do fabricante e checado por intermédio de digestões de restrição. O plasmídeo obtido deste modo é denotado pCLiK2.

O vetor pCLiK2 foi cortado pela endonuclease de restrição DraI (New England Biolabs, Beverly, USA). Depois da eletroforese em um gel de agarose a 0,8 % de concentração, um fragmento de vetor de aprox. 2,3 kb foi isolado com o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este fragmento de vetor foi religado com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção para células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico de um clone individual foi isolado usando o Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as informações do fabricante e checados por intermédio de digestões de restrição. O plasmídeo obtido deste modo é denotado pCLiK3.

Partindo do plasmídeo pWLQ2 (Liebl *et al.*, 1992) como padrão para uma reação de PCR, a origem pHM1519 de replicação foi amplificada usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 9:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO: 10:

5'-GAGAGGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

À parte das seqüências complementares para pWLQ2, os iniciadores de oligonucleotídeo da SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10 compreendem sítios de clivagem para a endonuclease de restrição NotI. A reação de PCR foi realizada pelo método padrão tal como Innis *et al.* (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)), usando PfuTurbo polimerase (Stratagene, La Jolla, USA). O fragmento de DNA obtido, cujo tamanho é de aproximadamente 2,7 kb, foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. O fragmento de DNA foi cortado pela endonuclease de restrição NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) e subsequente purificado mais uma vez usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. O vetor pCLiK3 foi do mesmo modo cortado pela endonuclease de restrição NotI e desfosforilado pela fosfatase alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) de acordo com as informações do fabricante. Depois da eletroforese em um gel de agarose a 0,8 % de concentração, o vetor linearizado (aprox. 2,3 kb) foi isolado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este fragmento de vetor foi ligado com o fragmento de PCR cortado com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápido (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em ágar LB contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico de um clone individual foi isolado usando o Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as informações do fabricante e checada por intermédio de digestões de restrição. O plasmídeo obtido deste modo é denotado pCLiK5.

5 De modo a estender pCLiK5 por um “sítio de clonagem múltiplo” (MCS), os dois oligonucleotídeos sintéticos, essencialmente complementares da SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, que compreendem
10 sítios de clivagem para as endonucleases de restrição SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, SalI, ClaI, BamHI, XbaI e SmaI foram combinados aquecendo-os juntos a 95° C seguido pelo esfriamento lento para dar um fragmento de DNA de filamento duplo.

SEQ ID NO: 11:

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCCGGTAC
CACGCGTCATATGACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCG
ATGCTCTTCTGCGTTAATTAACAATTGGGATCCTCTAGACCCGGGA
TTTAAAT-3'

SEQ ID NO: 12:

5'-GATCATTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAAT
TAACGCAGAAGAGCATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAC
TAGTCATATGACGCGTGGTACCGGGCCCGACGTCAGGCCTCTCGA
GATITAAAT-3'

15 O vetor pCLiK5 foi cortado pelas endonucleases de restrição XhoI e BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) e defosforilado pela fosfatase alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) de acordo com as informações do fabricante. Depois da eletroforese em um gel de agarose a 0,8 % de concentração, o vetor linearizado (aprox. 5,0 kb) foi isolado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este fragmento de vetor foi ligado com o fragmento de DNA de filamento duplo sintético com a

ajuda da Rapid DNA Ligação Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), into *E. coli* competente
 5 XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico de um clone individual foi isolado usando o Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as
 10 informações do fabricante e checado por intermédio de digestões de restrição. O plasmídeo obtido deste modo é denotado pCLiK5MCS.

As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas
 15 por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha).

O plasmídeo resultante, pCLiK5MCS, está listado como a SEQ ID NO: 13.

Exemplo 2:

20 Preparação do plasmídeo PmetA metA

O DNA cromossômico ATCC 13032 de *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15, o DNA
 25 cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), o gene metA, que inclui a região 5' não codificadora, foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 14

5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT-3'

e

SEQ ID NO: 15

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT-3'

O fragmento de DNA de aprox. 1,3 kb obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequentemente clivado pelas enzimas de restrição Asp718 e SpeI (Roche
5 Diagnostics, Mannheim) e o fragmento de DNA foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

O vetor pClik5MCS SEQ ID NO: 13 foi cortado pelas enzimas de restrição Asp718 e Spat e um fragmento de 5 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band
10 Purification.

O fragmento de vetor foi ligado junto com o fragmento de PCR com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook
15 *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com
20 materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizados de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante, pCLiK5MCS PmetA metA, está listado como SEQ ID NO: 16.

Exemplo 3:

Preparação do plasmídeo pCLiK5MCS Psod metA

5 O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 18, o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um
10 fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base da região não codificadoras 5' (região da unidade de expressão) da superóxido dismutase (Psod) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão tais como Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 17

5'-GAGACTCGAGAGCTGCCAA1TATTCCGGG-3'

e

SEQ ID NO: 18

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGGTAAAAAATCCTTTC G -3'

15 O fragmento de DNA obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Partindo do plasmídeo PmetA metA SEQ ID NO: 16 como padrão para uma reação de PCR, metA foi parcialmente amplificado usando
20 os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 19 5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

e

SEQ ID NO: 20 5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

O fragmento de DNA obtido de aproximadamente 470 pares

de base foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante.

Os dois fragmentos obtidos acima foram usados junto como padrão em uma outra reação de PCR. No curso da reação de PCR, as
5 seqüências homólogas a metA introduzidos com o iniciador de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 18 faz com que os dois fragmentos se liguem entre si e sejam prolongados pela polimerase usada para dar uma cepa de DNA contínua. O método padrão foi modificado em que os iniciadores de oligonucleotídeo usados, SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 20, foram apenas
10 adicionados à mistura de reação no início do 2º ciclo.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 675 pares de base foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi
subseqüentemente clivado pelas enzimas de restrição XhoI e NcoI (Roche
15 Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 620 pares de base foi depois purificado a partir de agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg).

O plasmídeo PmetA metA da SEQ ID NO: 16 foi clivado pelas
20 enzimas de restrição NcoI e SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Depois do fracionamento pela eletroforese em gel, um fragmento metA de aprox. 0,7 kb foi purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

O vetor pClik5MCS da SEQ ID NO: 13 foi cortado pelas
25 enzimas de restrição XhaI e SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) e um fragmento de 5 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

O fragmento de vetor foi ligado junto com o fragmento de PCR e o fragmento metA com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida

(Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo obtido, pCLIK5MCS PSODmetA, está listado como a SEQ ID NO: 21.

Exemplo 4:

Preparação do plasmídeo pCLiK5MCS P EF-TU metA

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 23, o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base da região não codificadora 5' (região promotora) da superóxido dismutase (Psod) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão tais como Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 22 5'-GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG -3'

e

SEQ ID NO: 23

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGGIGGGCATTGTATGTCCTCCTGGAC -3'

O fragmento de DNA obtido foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

5 Partindo do plasmídeo PmetA metA da SEQ ID NO: 16 como padrão para uma reação de PCR, metA foi parcialmente amplificado usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 24 e SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 24 5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

e

SEQ ID NO: 25 5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

O fragmento de DNA obtido de aproximadamente 470 pares de base foi purificado usando o GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification Kit de acordo com as informações do fabricante.

10 Os dois fragmentos obtidos acima foram usados juntos como padrão em uma outra reação de PCR. No curso da reação de PCR, as seqüências homólogas a metA introduzidas com o iniciador de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 18 faz com que os dois fragmentos se liguem entre si e sejam prolongados pela polimerase usada para dar uma cepa de
15 DNA contínua. O método padrão foi modificado em que os iniciadores de oligonucleotídeo usados, a SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 25, foram apenas adicionados à mistura de reação no início do 2º ciclo.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 675 pares de base foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band
20 Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequentemente clivado pelas enzimas de restrição XhoI e NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 620 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham

Pharmacia, Freiburg).

O plasmídeo PmetA metA da SEQ ID NO: 16 foi clivado com as enzimas de restrição NcoI e SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Depois do fracionamento pela eletroforese em gel, um fragmento metA de aprox. 0,7 kb foi purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

O vetor pClik5MCS da SEQ ID NO: 13 foi cortado pelas enzimas de restrição XhoI e SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) e um fragmento de 5 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

O fragmento de vetor foi ligado junto com o fragmento da PCR e o fragmento metA com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As Reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliada por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo obtido, pCLiK5MCS P_EFTUmetA, está listado como SEQ ID NO: 26.

Exemplo 5:

Preparação do plasmídeo pCLiK5MCS Pgro metA

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 28, o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base da região não codificadora 5' (região promotora) do gene GroES (Pgro) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão tais como Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 27

5'-GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTGGCTGCC -3'

SEQ ID NO: 28

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGATGAATCCCTCCATGA G-3'

O fragmento de DNA obtidos foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Partindo do plasmídeo PmetA metA como padrão para uma reação de PCR, metA foi parcialmente amplificado usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30.

SEQ ID NO: 29

5'-CCCACCCTCGCGCCTTGAG -3'

SEQ ID NO: 30

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

O fragmento de DNA obtido de aproximadamente 470 pares de base foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante.

Os dois fragmentos obtidos acima foram usados juntos como padrão em uma outra reação de PCR. No curso da reação de PCR, as

seqüências homólogas a metA introduzidas com o iniciador de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 28 fazem com que os dois fragmentos se liguem entre si e sejam prolongados pela polimerase usada para dar uma cepa de DNA contínua. O método padrão foi modificado em que os iniciadores de
5 oligonucleotídeo usados, SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 30, foram apenas adicionados à mistura de reação no início do 2º ciclo.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 675 pares de base foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi
10 subsequenteclmente clivado pelas enzimas de restrição XhoI e NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionados pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 620 pares de base foi depois purificado da agarose, usando o Kit GFK® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg).

15 O plasmídeo PmetA metA SEQ ID NO: 16 foi clivado pelas enzimas de restrição NcoI e SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Depois do fracionamento pela eletroforese em gel, um fragmento metA de aprox. 0,7 kb foi purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification.

20 O vetor pClik5MCS SEQ ID NO: 13 foi cortado pelas enzimas de restrição XhoI e SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) e um fragmento de 5 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification.

O fragmento de vetor foi ligado junto com o fragmento de
25 PCR e o fragmento metA com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla,

U\$A). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB  gar contendo canamicina (20  m/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo obtido, pCLIK5MCS Pgro metA, é listada como a SEQ ID NO: 31.

Exemplo 6:

Preparação do plasmídeo P EF-TS metA

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparada de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo BK 1849 (SEQ ID NO: 32) e BK 1862 (SEQ ID NO: 33), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), o gene MetaA que codifica a homoserina O-acetiltransferase foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

BK 1849 (SEQ ID NO: 32)

5'- GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG -3'

e

BK 1862 (SEQ ID NO: 33)

5'-ATGCCCACCCTCGCGCC -3'

O fragmento de DNA de aprox. 1134 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[ ] PCR, DNA and Gel Band Purification

(Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Usando os iniciadores de oligonucleotídeo Haf 26 (SEQ ID NO: 34) e Haf 27 (SEQ ID NO: 35), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base da região não codificadora 5' (região da unidade de expressão) do gene que codifica o fator de alongamento TS foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

Haf 26 (SEQ ID NO: 34)

5'-GAGAGGATCCCCCCCCACGACAATGGAAC-3'

e

Haf 27 (SEQ ID NO: 35)

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGIGGGCATTACGGGGCGATCCTCCTTATG-3'

O fragmento de DNA de aprox. 195 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Os iniciadores Hat 27 e BK 1862 compreendem uma sequência de sobreposição e a suas extremidades 5' são homólogas entre si.

Os produtos de PCR obtidos acima foram usados como padrão para outra PCR que faz uso dos iniciadores BK 1849 (SEQ ID NO: 32) e Haf 26 (SEQ ID NO: 34).

Usando este método, um fragmento de DNA foi amplificado que correspondeu ao tamanho esperado de 1329 pares de base. Esta fusão P EF-TS/metA foi depois clonada por intermédio dos sítios de clivagem de restrição BamHI e SalI no vetor pClik 5a MCS (SEQ ID NO: 13).

O fragmento de vetor foi ligado junto com o fragmento de PCR com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante foi aludido como pClik 5a MCS P EF-TS metA (SEQ ID NO: 36).

Exemplo 7:

Preparação do plasmídeo P EF-Tu pSOD metA (H473)

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo BK 1753 (SEQ ID NO: 37) e BK 1754 (SEQ ID NO: 38), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), o terminador GroEL foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

BK 1753 (SEQ ID NO: 37)

GGATCTAGAGTTCTGTGAAAAACACCGTG

BK 1754 (SEQ ID NO: 38)

GCGACTAGTGCCCCACAAATAAAAAACAC

O fragmento de DNA de aprox. 77 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante, cortado pelas enzimas de restrição XbaI e BcuI e purificado uma vez mais.

O vetor pClik5MCS (SEQ ID NO: 13) foi linearizado pela enzima de restrição XbaI e purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

O vetor linearizado foi ligado junto com o fragmento de PCR com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O resultante plasmídeo foi aludido como H247 (SEQ ID NO: 39).

Este plasmídeo foi tratado com as enzimas de restrição BcuI e SalI e purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do

fabricante.

Uma PCR usando os oligonucleotídeos BK 1848 (SEQ ID NO: 40) e BK 1849 (SEQ ID NO: 41), o plasmídeo pClikSMCS Psod metA (SEC) ID NO: 21) como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene) foi realizado
 5 pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. O fragmento amplificado teve um comprimento esperado de aprox. 1350 pares de base e foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do
 10 fabricante, cortado pelas enzimas de restrição BcuI e SalI e purificado uma vez mais.

Este fragmento foi ligado com o plasmídeo H247 (sítios de clivagem BcuI e SalI) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a
 15 mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955,
 20 Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram
 25 fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante foi aludido como pG A4 (H344) e é listada sob SEQ ID NO: 42.

SEQ ID NO: 40 (BK 1848)

GAGAACTAGTAGCTGCCAATTATTCCGGG

SEQ ID NO: 41 (BK 1849)

GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG

O plasmídeo pG A4 (SEQ ID NO: 42) foi cortado pelas enzimas de restrição XhoI e BcuI e purificado usando o Kit GPX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

5 Construção de H473:

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores oligonucleotídicos BK 1695 (SEQ ID NO: 43) e Haf16 (SEQ ID NO: 44), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 182 pares de base da região não codificadora 5' (região da unidade de expressão) do gene EF Tu (Pefu) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 43 (BK1695)

GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG

SEQ ID NO: 44 (Haf16)

GAGAACTAGTGTGGCTACGACTTTCGCAGC

O fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante, cortado pelas enzimas de restrição Xho I e Bcu I e purificado uma vez mais.

Este fragmento foi ligado com o plasmídeo pG A4 (H344) (sítios de clivagem XhoI e BcuI) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA

Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)), em *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O plasmídeo obtido foi aludido como pClik5MCS PeftuPsod metA (H473). Este está listado sob SEQ ID NO: 45. Este compreende (de 5' para 3') um promotor Peftu, uma unidade de expressão Psod e, imediatamente a jusante desta, a matriz de leitura aberta metA.

Exemplo 8:

Preparação do plasmídeo PsodPeftu metA (H605)

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 46 (Haf64) e SEQ ID NO: 47 (Haf65), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base da região não codificadora 5' (região da unidade de expressão) do gene EF Tu (Peftu) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descritos em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 46 (Haf64)

GAGAACTAGTGGCCGTTACCCTGCGAATG

SEQ ID NO: 47 (Haf65)

GCGCGAGGGTGGGCATTGTATGTCCTCCTGGACTTC

O fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification

(Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Em uma segunda PCR, usando os iniciadores de oligonucleotídeo BK1862 (SEQ ID NO: 48) e BK1849 (SEQ ID NO: 49) e o plasmídeo H344 (SEQ ID NO: 42) como padrão, a matriz de leitura aberta metA foi amplificado pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. O fragmento de aprox. 1140 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

SEQ ID NO: 48 (BK1862)

ATGCCCACCCTCGCGCC

SEQ ID NO: 49 (BK1849)

GTGTGTCGACTTAGATGTAGAACTCGATGTAG

Os dois fragmentos obtidos acima foram usados juntos como padrão em uma outra reação de PCR. No curso da reação de PCR, as seqüências homólogas a metA introduzidas com o iniciador de oligonucleotídeo Haf 65 SEQ ID NO: 47 faz com que os dois fragmentos se liguem entre si e sejam prolongados pela polimerase usada para dar uma cepa de DNA contínua. O método padrão foi modificado em que os iniciadores de oligonucleotídeo usados, Haf 64 e BK 1849 SEQ ID NO: 46 e SEQ ID NO: 49 foram apenas adicionados à mistura de reação no início do 2º ciclo.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 1350 pares de base foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequenteclivado pelas enzimas de restrição BcuI e SalI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 1340 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification

(Amersham Pharmacia, Freiburg). Este fragmento compreende a unidade de expressão Peftu fundido à ORF metA (= fragmento Peftu-metA).

Usando os iniciadores de oligonucleotídeo BK 1697 (SEQ ID NO: 50) e Haf17 (SEQ ID NO: 51), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA (comprimento total: 193 pares de base, 173 destes sendo pSOD) da região não codificadora 5' (região da unidade de expressão) do gene SOD (Psod) amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 50 (BK 1697)

GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG

SEQ ID NO: 51 (Haf 17)

GAGAACTAGTTAGGTTCCGCACCGAGC

O fragmento de DNA amplificado foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequentelemente clivado pelas enzimas de restrição XhoI e BcuI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 180 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) (= fragmento Psod).

O plasmídeo (H344) pG A4 SEQ ID NO: 42 foi clivado pelas enzimas de restrição XhoI e SalI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O vetor linearizado foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg).

O vetor linearizado foi ligado com os dois fragmentos (fragmento de Peftu-metA e fragmento de Psod) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as

informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam
 5 plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of
 10 Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante, pClik5MCS PsodPeftu metA, é listado como SEQ ID NO: 52.

Exemplo 9:

Preparação do plasmídeo pClik5MCS Pgro Psod metA (H472)

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.*, (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores
 20 de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 53 (BK1701) e SEQ ID NO: 54 (Hafl 8), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 175 nucleotídeo foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications,
 25 Academic Press. Este compreende 155 pares de base da região não codificadora 5' (região da unidade de expressão) do gene GRO EL (Pgro) e um sítio de clivagem de restrição em cada uma das extremidades 5' e 3' (XhoI e BcuI, respectivamente).

SEQ ID NO: 53 (BK1701)

GAGACTCGAGCGGCTTAAAGYTTGGCTGCC

SEQ ID NO: 54 (Haf018)

GAGAACTAGTAI61IGTGTGTGCCGGTTGTG

O fragmento de DNA de aprox. 175 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequentelemente clivado pelas enzimas de restrição XhoI e BcuI (Roche Diagnostics, Mannheim) e o fragmento de DNA foi purificado usando o GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

O plasmídeo H344 (SEQ ID NO: 42) foi cortado pelas enzimas de restrição XhoI e BcuI e um fragmento de aprox. 6,4 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

O produto da PCR e o plasmídeo H344 cortado-aberto foram ligados com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467.

As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante compreende um promotor Pgro imediatamente seguido por uma unidade de expressão Psod e a ORF metA.

Este está listado como pCLiK5MCS PgroPsod metA (H472) sob a SEQ ID NO: 55.

Exemplo 10:

Preparação do plasmídeo PgroPsod Pefts metA (HSO1)

5 Uma PCR usando os iniciadores de oligonucleotídeo BK1782 (SEQ ID NO: 56) e Haf63 (SEQ ID NO: 57) e o plasmídeo pClikSMCS Pgro Psod metA (SEQ ID NO: 55 (H472)) como padrão foi realizada pelos métodos padrão como descritos em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. O fragmento amplificado compreende aprox. 474 pares de base e um cassete Pgro-Psod com um sítio de clivagem Acc65I na extremidade 3'. O fragmento de DNA obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. este foi subsequenteclivado pelas enzimas de restrição 10 XhoI e Acc65I e o fragmento de DNA (333 pares de base) foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

15 SEQ ID NO: 56 (BK1782)

TCGAGAGATTGGATTCTTAC

SEQ ID NO: 57 (Hat 63)

TCTCGGTACCCCGCACCGAGCATATACATC

O plasmídeo H479 (SEQ ID NO: 58) compreende a unidade de expressão Pefts fundido à ORF metA. Este foi cortado (diretamente a montante de Pefts) pelas enzimas de restrição XhoI e Acc65I e um fragmento 20 de aprox. 6,4 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

Este foi depois ligado com o fragmento de PCR (cassete Pgro-Psod) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de 25 ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook

et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam o plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante compreende os 3 promotores, Pgro, Psod e P EF -Ts, fundidos à ORF metA.

Este está listado como pCLiK5MCS Pgro Psod Pefts metA (HSO1) sob a SEQ ID NO: 59.

Exemplo 11:

Preparação do plasmídeo Peftu Psod Pefts metA (HSO2)

Uma PCR usando os iniciadores de oligonucleotídeo BK1782 (SEQ ID NO: 56) e Haf63 (SEQ ID NO: 57) e o plasmídeo pClik5MCS Peftu Psod (SEQ ID NO: 45 (H473)) como padrão foi realizada pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. O fragmento amplificado compreende aprox. 495 pares de base e um cassete Peftu-Psod com um sítio de clivagem Acc65I na extremidade 3'. O fragmento de DNA obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequente clivado pelas enzimas de restrição XhoI e Acc65I e o fragmento de DNA (354 pares de base) foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification.

SEQ ID NO: 56 (BK1782)

TCGAGAGATTGGATTCTTAC

SEQ ID NO: 57 (Haf 63)

TCTCGGTACCCCGCACCGAGCATATACATC

O plasmídeo H479 (SEQ ID NO: 58) compreende a unidade de expressão Pefts fundida à ORF metA. Este foi cortado (diretamente a montante de Pefts) pelas enzimas de restrição XhoI e Acc65I e um fragmento de aprox. 6,4 kb foi isolado, depois do fracionamento eletroforético, usando o
5 Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification.

Este foi depois ligado com o fragmento de PCR (cassete Peftu-Psod) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook
10 *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com
15 materiais da Quiagen. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de sequenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

20 O plasmídeo resultante compreende as 3 seqüências reguladoras, Peftu, Psod e PEF -Ts, fundido à ORF metA. Este está listado como pCLiK5MCS Peftu Psod Pefts metA (HSO1) sob a SEQ ID NO: 60.

Exemplo 12:

Medição das atividades de metA

25 A cepa ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum* foi

transformada em cada caso com os plasmídeos pClik5 MCS, pClik MCS Psod metA, pClik MCS Peftu metA, pClikS MCS Pefts metA, pClikS MCS Peftu Psod metA, pClik5 MCS Psod Peftu metA, pClik5 MCS Pgro Psod meta, pClik5 MCS Pgro Psod Pefts metA, pClik5 MCS Peftu Psod Pefts metA de acordo com o método descrito (Liebl, *et al.* (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303). A mistura de transformação foi plaqueada em placas CM que adicionalmente contiveram 20 mg/L de canamicina de modo a obter a seleção quanto as células contendo plasmídeo. Os clones resistentes à canamicina obtidos foram escolhidas e diluídos.

As cepas de *C. glutamicum* que compreendem qualquer uma das ditas construções de plasmídeo foram cultivadas em Meio MMA ((40 g/l de sacarose, 20 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de K_2HPO_4 , 0,25 g/ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 54 g de Aces, 1 ml de CaCl_2 (10 g/l), 1 ml de protocatecuato (300 mg/10 ml), 1 ml de solução de elemento traço (10 g/l de $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 g/l de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l de $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l de CuSO_4 , 0,02 g/l de $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), 100 $\mu\text{g/l}$ de vitamina B_{12} , 0,3 mg/l de tiamina, 1 mM de leucina, 1 mg/l de piridoxal HCl, 1 ml de biotina (100 mg/l), pH 7,0) a 30° C durante a noite. As células foram removidas pela centrifugação a 4° C e lavada duas vezes com tampão de Tris-HCl fria (0,1 %, pH 8,0). Depois de outra centrifugação, as células foram absorvidas em tampão de Tris-HCl frio (0,1 %, pH 8,0) e a OD600 foi ajustada a 160. As células foram rompidas pela transferência de 1 ml desta suspensão de célula a 2 ml de tubos Hybaid Ribolyser e lisados três vezes em cada caso por 30 s em um Hybaid Ribolyser, com rotação ajustada a 6,0. O lisado foi clarificado pela centrifugação em uma centrífuga Eppendorf a 15 000 rpm e 4° C por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido a um novo copo de Eppendorf. O teor de proteína foi determinado de acordo com Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254.

A atividade enzimática de MetA foi realizada como segue. As

misturas de reação de 1 ml contiveram 100 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,5), 5 mM de $MgCl_2$, 100 μM de acetilCoA, 5 mM de L-homosserina, 500 μM de DTNB (Reagente de Ellman) e extrato celular. O ensaio foi iniciado pela adição do lisado de proteína relevante e incubados na temperatura ambiente. As cinéticas foram depois registradas a 412 nm por 10 min.

Os resultados estão representados na Tabela 1a.

Tabela 1a

Cepa	Nome da construção interna	Atividade específica
ATCC 13032 pClik5MCS	H356 (metZ)	3,1
ATCC 13032 pCLiK5MCS Psod metA	H144	1308,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu metA	H146	1233,0
ATCC 13032 pCLIK5MCS Pefts metA	H479	2339,0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu Psod metA	H473	2308,1
ATCC 13032 pCLiK5MCS Psod Peftu metA	HSO5	2061,9
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro Psod metA	H472	1501,6
ATCC 13032 pCLIK5MCS Pgro Psod Pefts metA	HSO1	1773,4
ATCC 13032 pCLiK5MCS Peftu Psod Pefts metA	HSO2	2262,2

Foi possível modular a atividade de MetA usando-se as várias combinações de promotores/unidades de expressão.

Exemplo 13:

Construção do plasmídeo pCIS lysC

De modo a gerar uma cepa que produz lisina, uma substituição alélica do gene tipo selvagem lysC foi realizada na *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Isto envolveu uma substituição de nucleotídeo no gene lysC de modo que o aminoácido Thr na posição 311 foi substituído por um Ile na proteína resultante. Partindo do DNA cromossômico de ATCC13032 como padrão para uma reação de PCR, lysC foi amplificado com a ajuda do PfuTurbo PCR Systems (Stratagene USA) usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 62, de acordo com as informações do fabricante.

SEQ ID NO: 61

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC --3'

SEQ ID NO: 62

5'-CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. O fragmento amplificado é flanqueado por um corte de restrição Sall na sua extremidade 5' e por um corte de restrição MluI na sua extremidade 3'. Antes da clonagem, o fragmento amplificado foi digerido por estas duas enzimas de restrição e purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg).

O polinucleotídeo obtido foi clonado por intermédio dos cortes de restrição Sall e MluI em pCLIK5 MCS integrativo SacB, aludido como pCIS mais abaixo (SEQ ID NO: 63) e transformado no *E. coli* XL-1 blue. A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190). O plasmídeo foi isolado e a seqüência de nucleotídeo esperada foi confirmada pelo seqüenciamento. O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As Reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). O plasmídeo obtido, pCIS lysC, é listado como a SEQ ID NO: 64.

Exemplo 14:

Mutagênese do gene lysC da *C. glutamicum*

A mutagênese direcionada do gene LysC da *C. glutamicum* foi realizada usando o Kit Quick-Change (Stratagene/USA) de acordo com as

informações do fabricante. A mutagênese foi realizada no plasmídeo pCIS lysC, SEQ ID NO: 64,. Para substituir thr 311 com 311 ile com a ajuda do método Quick-Change (Stratagene), os seguintes iniciadores de oligonucleotídeo foram sintetizados:

SEQ ID NO: 65

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3'

SEQ ID NO: 66

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3'

5 O uso destes iniciadores de oligonucleotídeo na reação Quick-Change resulta em uma substituição do nucleotídeo na posição 932 (de C a T) no gene lysC da SEQ ID NO: 67. A substituição de aminoácido resultante, Thr3Ile, no gene LysC foi confirmado por um reação de seqüenciamento, depois da transformação na *E. coli* XL1-blue e preparação de plasmídeo. O
10 plasmídeo foi denotado pCIS lysC thr311ile e é listada como SEQ ID NO: 68.

O plasmídeo pCIS lysC thr311ile foi transformada na *C. glutamicum* ATCC13032 por meio da eletroporação como descrito em Liebi, *et al.* (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303. As modificações do protocolo estão descritas na DE 10046870. O arranjo cromossômico do local
15 lysC de transformantes individuais foi checado pelos métodos padrão através da Southern blot e hibridização, como descrito em Sambrook *et al.* (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. Isto garantiu que os transformantes integraram o plasmídeo transformado no local lysC por intermédio da recombinação homóloga. Depois de cultivar tais colônias em
20 meio que não contém nenhum antibiótico durante a noite, as células são plaqueadas em um meio de sacarose CM-ágar (10 % de sacarose, 10 g/l de glicose; 2,5 g/l de NaCl; 2 g/l de uréia, 10 g/l de Bacto Peptona (Difco); 10 g/l de extrato de levedura, 22,0 g/L de ágar (Difco)) e incubadas a 30° C por 24 horas.

25 Visto que o gene sacB presente no vetor pCIS LysC thr311ile

converte a sacarose em um produto tóxico, apenas aquelas colônias podem crescer em que o gene *sacB* foi deletado por uma segunda etapa de recombinação homóloga entre o gene *lysC* do tipo selvagem e o gene *lysC* thr311ile mutado. É possível, durante a recombinação homóloga, para o gene do tipo selvagem ou o gene mutado ser deletado junto com o gene *sacB*. Se o gene *sacB* é removido junto com o gene do tipo selvagem, o resultado é um transformante mutado.

As colônias que se desenvolvem são escolhidas e testadas quanto a um fenótipo sensível à canamicina. Os clones com o gene *sacB* deletado, ao mesmo tempo, devem demonstrar comportamento de crescimento sensível à canamicina. Tais clones sensíveis à canamicina foram testados em um frasco agitador quanto à sua produtividade de lisina (ver o Exemplo 19). A *C. glutamicum* ATCC13032 não tratada foi cultivada por comparação. Os clones tendo produção de lisina aumentada, comparados com o controle, foram selecionados, o DNA cromossômico foi recuperado e a região correspondente do gene *lysC* foi amplificada por uma reação de PCR e seqüenciada. Um clone deste tipo, que tem a propriedade de síntese de lisina aumentada e uma mutação detectada em *lysC* na posição 932, foi denotado ATCC13032 *lysC'*br.

Exemplo 15:

Preparação do plasmídeo pCIS Peftu ddh

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 69 (Old38) e SEQ ID NO: 70 (Old 39), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base da região não codificadora 5' (região da unidade de expressão) do gene EFTu (Peftu) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como

descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO: 69 (01d38)

ACATCCATGGTGGCCGTTACCCTGCGAAT

SEQ ID NO: 70 (Old 39)

TGTATGTCCTCCTGGACTTC

O fragmento de DNA de aprox. 200 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Em uma segunda PCR, usando os iniciadores de oligonucleotídeo Old40 (SEQ ID NO: 71) e SEQ ID NO: 72 (Old 37) e o DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* como padrão, a matriz de leitura aberta ddh foi amplificada pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. O fragmento de aprox. 1017 pares de base obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante.

Old40 (SEQ ID NO: 71)

GAAGTCCAGGAGGACATACAATGACCAACATCCGCGTAGC

Old 37 (SEQ ID NO: 72)

GAAACCACACTG'I CCTTGC

Os dois fragmentos obtidos acima foram usados juntos como padrão em uma outra reação de PCR. No curso da reação de PCR, as seqüências homólogas a Peftu introduzidas com o iniciador de oligonucleotídeo Old40 SEQ ID NO: 71 faz com que os dois fragmentos se liguem entre si e sejam prolongados pela polimerase usada para dar uma cepa de DNA contínua. O método padrão foi modificado em que os iniciadores de

oligonucleotídeo usados, Old37 e Old 38 (SEQ ID NO: 72 e SEQ ID NO: 69), foram apenas adicionados à mistura de reação no início do 2º ciclo.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 1207 pares de base foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequente-mente clivado pelas enzimas de restrição NcoI e XhoII (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 1174 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg). Este fragmento compreende a unidade de expressão Peftu fundido à ORF ddh (= fragmento Peftu-ddh).

Usando os iniciadores de oligonucleotídeo Old 32 (SEQ ID NO: 73) e Old 33 (SEQ ID NO: 74), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA da região não codificadora 5' do gene ddh foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão como descrito em Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID 73 (Old32)

ATCAACGCGTCGACACCACATCATCAATCAC

SEQ ID 74 (Old33)

ATCACCATGGGTTCTTGTAATCCTCCAAAATTG

O fragmento de DNA amplificado foi purificado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequente-mente clivado pelas enzimas de restrição MluI e NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento de DNA de aprox. 720 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) (= fragmento 5' ddh).

O plasmídeo pCIS (SEQ ID NO: 63) foi clivado pelas enzimas de restrição MluI e XhoI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O vetor linearizado foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg),

O vetor linearizado foi ligado com os dois fragmentos (fragmento Peftu-ddh e fragmento 5' ddh) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

O DNA plasmídico foi preparado pelos métodos e com materiais da Quiagen. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

O plasmídeo resultante, pCIS Peftu ddh, está listado como a SEQ ID NO: 75.

Exemplo 16:

Preparação de pCIS PeftuPsod ddh

O DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um

fragmento de DNA de aprox. 677 pares de base da região 5' do gene *ddh* foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) pelos métodos padrão tais como Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (fragmento 5' *ddh*).

SEQ ID NO: 76 (CK461)

CCTGACGTCGCAATATAGGCAGCTGAATC

SEQ ID NO : 77 (CK466)

GCCCAATTGGTTCTTGTAATCCTCCAAAA

5 O fragmento de DNA obtido foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este foi subsequente-mente clivado pelas enzimas de restrição AatII e MunI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese em gel. O fragmento
10 de DNA de aprox. 661 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg). O fragmento resultante compreende a região 5' da ORF *ddh*.

Partindo do plasmídeo P EF-Tu pSOD *metA* (H473) (SEQ ID
15 45) como padrão para uma reação de PCR, um cassete *P_{eftu}Psod* foi amplificado usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79.

SEQ ID NO: 78 (CK426)

CGCCAATTGTCGAGGGCCGTTACCCT

SEQ ID NO: 79 (CK463)

GCTACGCGGATGTTGGTCATGGGTAAAAAATCCTTTCGTA

O fragmento de DNA obtido de aproximadamente 378 pares de base foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band
20 Purification de acordo com as informações do fabricante.

A ORF *ddh* foi amplificado em uma PCR subsequente. Para

este propósito, o DNA cromossômico ATCC 13032 da *C. glutamicum* foi preparado de acordo com Tauch *et al.* (1995) Plasmid 33: 168-179 ou Eikmanns *et al.* (1994) Microbiology 140: 1817-1828. Usando os iniciadores de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 80 (CK464) e SEQ ID NO: 81 (CK467), o DNA cromossômico como padrão e Pfu Turbo polimerase (Stratagene), um fragmento de DNA de aprox. 992 pares de base (ORF ddh) foi amplificado com a ajuda da reação da cadeia da polimerase (PCR) de acordo com os métodos padrão tais como Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press. O fragmento de DNA amplificado foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante.

SEQ ID NO: 80 (CK464)

TACGAAAGGATTTTTTACCCATGACCAACATCCGCGTAGC

SEQ ID NO: 81 (CK467)

AGACCCGGGTTAGACGTCGCGTGCGATCA

Os dois fragmentos obtidos acima (cassete PefuPsod e ORF ddh) foram usados junto como padrão em uma outra reação de PCR no curso da reação de PCR, as seqüências homólogas de Psod introduzidas com o iniciador de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 80 (CK464) faz com que os dois fragmentos se liguem entre si e sejam prolongados pela polimerase usada para dar uma cepa de DNA contínua. O método padrão foi modificado em que os iniciadores de oligonucleotídeo usados, SEQ ID NO: 79 (CK426) e SEQ ID NO: 81 (CK467), foram apenas adicionados à mistura de reação no início do 2º ciclo.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 1359 pares de base foi purificado usando o Kit GFX[®] PCR, DNA and Gel Band Purification de acordo com as informações do fabricante.

Este foi subsequenteclivado pelas enzimas de restrição MunI e SmaI (Roche Diagnostics, Mannheim) e fracionadas pela eletroforese

em gel. O fragmento de DNA de aprox. 1359 pares de base foi depois purificado a partir da agarose, usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg).

5 O fragmento resultante compreende (de 5' a 3') um promotor Peftu, uma unidade de expressão Psod e, imediatamente a jusante desta, a matriz de leitura aberta ddh (PeftuPsod ddh).

10 O vetor pCIS foi cortado pelas endonucleases de restrição AatII e SmaI e desfosforilado pela fosfatase alcalina (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante. Depois eletroforese em um gel de agarose a 0,8 % de concentração, o vetor linearizado (aprox. 4,2 kb) foi isolado usando o Kit GFX® PCR, DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia, Freiburg) de acordo com as informações do fabricante. Este fragmento de vetor foi ligado com os dois fragmentos de POR cortado (5'ddh e PeftuPsod ddh) com a ajuda do Kit de Ligação de DNA Rápida (Roche Diagnostics, Mannheim) de acordo com as informações do fabricante e a mistura de ligação foi transformada pelos métodos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)), na *E. coli* competente XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA). A seleção quanto às células que abrigam plasmídeo foi obtida
15 plaqueando-se em LB ágar contendo canamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).
20

O DNA plasmídico de clones individuais foi isolado usando o Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as informações do fabricante e checado por intermédio de digestões de restrição.
25 Dois plasmídeos corretos foram seqüenciados. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.* (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. As reações de seqüenciamento foram fracionadas e avaliadas por meio do ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). O plasmídeo resultante, pClik Peftu

Psod ddh, é adequado para integrar o cassete PeftuPsod cromossomicamente a montante da ORF ddh com a ajuda de dois eventos de recombinação sucessivo.

O plasmídeo pCIS PeftuPsod ddh está listado como SEQ ID
5 NO: 82.

Exemplo 17:

Geração das cepas ATCC13032 lysC^{fbr} Peftu ddh e
ATCC13032 lysC^{fbr} PeftuPsod ddh

As células da cepa de *E. coli* Mn522 (Stratagene, Amsterdam,
10 Países Baixos) foram transformadas com cada um dos plasmídeos pCIS Peftu
ddh e pCIS PeftuPsod ddh e com o plasmídeo pTc15AcgIM de acordo com
Liebl, *et al.* (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303. O plasmídeo
pTc15AcgIM possibilita que o DNA seja metilado de acordo com o padrão de
metilação da *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Esta metilação
15 aumenta a estabilidade dos plasmídeos pCIS Peftu ddh e pCIS PeftuPsod ddh
nas células *C. glutamicum*. O DNA plasmídico foi subsequenteemente isolado
das células Mn522 pelos métodos padrão e introduzidos com a ajuda da
eletroporação na cepa ATCC 13032 ask (fbr) de *Corynebacterium*
glutamicum descrita acima. A dita eletroporação e a seleção subsequente em
20 placas CM contendo canamicina (25 µg/ml) produziu uma pluralidade de
transconjugantes. De modo a selecionar quanto ao segundo evento de
recombinação que deve excisar o vetor, os ditos transconjugantes foram
cultivados em meio CM sem canamicina durante a noite e subsequenteemente
plaqueados em placas CM contendo 10 % de sacarose para seleção. O gene
25 sacB presente no vetor pCIS codifica a enzima levan sacarose e, com cultivo
em sacarose, leva à síntese de levan. Visto que o levan é tóxico para a *C.*
glutamicum, apenas as células de *C. glutamicum* que perderam o plasmídeo
de integração devido à segunda etapa de recombinação crescem em meio
contendo sacarose (Jager *et al.*, Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-

5466). 100 clones resistentes à sacarose foram checados quanto a sua sensibilidade à canamicina. Em uma pluralidade dos clones testados, uma sensibilidade à canamicina foi também detectada, além da resistência à sacarose, que é esperada com a excisão desejada das seqüências de vetor. A reação da cadeia da polimerase (PCR) foi usada de modo a checar se a integração desejada da unidade de expressão Peftu ou PeftuPsod também ocorreu. Para esta finalidade, os clones particulares foram removidos da placa de ágar usando um palito de dente e colocados em suspensão em 100 µl de H₂O e fervidos a 95° C por 10 min. 10 µl da solução obtida foram em cada caso usados como padrão na PCR. Os iniciadores usados foram oligonucleotídeos que são homólogos à unidade de expressão a ser introduzida e ao gene ddh. As condições de PCR foram escolhidas como segue: desnaturação inicial: 5 min a 95° C; desnaturação: 30 s a 95° C; hibridização: 30 s a 55° C; amplificação: 2 min a 72° C; 30 ciclos: extensão final: 5 min a 72° C. Na mistura de reação contendo o DNA da cepa de partida, a escolha de oligonucleotídeos não produzem qualquer produto de PCR. Uma faixa foi esperada apenas para clones em que as unidades de expressão Peftu ou PeftuPsod foram integradas imediatamente 5' do gene ddh como um resultado da 2ª recombinação. A integração bem sucedida pelos clones testados positivos aqui foi além disso também confirmado através da análise de Southern blot (pelos métodos padrão como descrito, por exemplo, em Sambrook *et al.* (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)). 2 hidrólises diferentes com enzimas de restrição foram realizadas aqui para cada cepa a ser gerada, que hidrolisa permitiriam que a cepa de partida (ATCC13032 ask (fbr)) e a cepa desejada sejam distinguidas de nomo não ambíguo. O fato de que as cepas obtidas não têm quaisquer genes da canamicina no cromossoma foi além disso confirmado com a ajuda de uma sonda que é homóloga ao gene de resistência à canamicina.

Assim as seguintes cepas foram geradas:

ATCC13032 lysC^{fbr} Peftu ddh

ATCC13032 lysC^{fbr} PeftuPsod ddh

Todas estas cepas compreendem um gene ask desregulado na retroalimentação e portanto produzem lisina. Estas diferem entre si apenas pelas unidades reguladoras que controlam a transcrição do gene ddh.

Exemplo 18:

Efeito do realce de ddh por um promotor duplo sobre a produção de lisina

De modo a estudar o efeito do realce do gene ddh com a ajuda de um promotor duplo, as seguintes cepas foram testadas quanto a produção de lisina:

ATCC13032 lysCfbr

ATCC13032 lysCfbr Peftu ddh

ATCC13032 lysCfbr Peftu Psod ddh

Para este propósito, as cepas foram cultivadas em placas CM (10,0 g/L de D-glicose, 2,5 g/L de NaCl, 2,0 g/L de uréia, 10,0 g/L de Bacto Peptona (Difco), 5,0 g/L de Extrato de Levedura (Difco), 5,0 g/L de Extrato de Carne de Boi (Difco), 22,0 g/L de Ágar (Difco), autoclavado (20 min, 121° C)) a 30° C por 3 dias. As células foram depois retiradas por raspagem da placa e recolocadas em suspensão em solução salina. Para a cultura principal, 10 ml de meio I e 0,5 g de CaCO₃ autoclavado (Riedel de Haen) foram inoculados com a suspensão de célula a uma OD₆₀₀ de 1,5 em um frasco Erlenmeyer de 100 ml e incubados em um Infors AJ118 (Infors, Bottmingen, Suíça) a 220 rpm por 40 horas. Isto foi seguido pela determinação da concentração da lisina secretada no meio.

Meio I:

40 g/l Sacarose

60 g/l Melaços (com base em 100 % de teor de açúcar)

10 g/l (NH₄)₂SO₄

0,4 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,6 g/l KH_2PO_4

0,3 mg/l Tiamina*HCl

1 mg/l Biotina (a partir de uma solução de estoque de 1
5 mg/ml que foram esterilizadas pela filtração e ajustadas ao pH 8,0 com NH_4OH)

2 mg/l FeSO_4

2 mg/l MnSO_4

ajustado ao pH 7,8 com NH_4OH , autoclavado (121°C , 20
10 min).

Adicionalmente, vitamina B12 (hidroxicobalamina, Sigma Chemicals) é adicionada a partir de uma solução de estoque (200 $\mu\text{g/ml}$, esterilizados por filtração) a uma concentração final de 100 $\mu\text{g/l}$.

A concentração de aminoácido foi determinada por meio da
15 cromatografia líquida de alta pressão de acordo com a Agilent em um HPLC Agilent 1100 Série LC System. Uma derivatização de coluna de proteção com orto-ftalaldeído possibilita a quantificação dos aminoácidos formados e a mistura de aminoácido é fracionada em uma coluna Hypersil AA (Agilent).

O resultado do estudo está representado na tabela abaixo.

Cepa	Concentração de lisina relativa (%)
ATCC13032 LysC^{tbr}	100
ATCC13032 lysC^{tbr} Pefu ddh	102,9
ATCC13032 lysC^{tbr} PefuPsod ddh	106,9

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

```

<110> BASF AG
<120> Promotores Múltiplos
<130> M/45256
<160> 84
<170> PatentIn versão 3.1
<210> 1
<211> 177
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> misc_feature
<223> pGRO

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(177)
<223> sequência promotora se nenhum outro promotor a jusante ocorre

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(155)
<223> sequência promotora se um outro promotor está ligado a jusante

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(75)
<223> região -10 putativa

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)..(172)
<223> sequência de ligação de ribossoma putativa

<400> 1

cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcacct caacagttga gtgctggcac      60
tctcgggggt agagtgccaa ataggttggt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg      120
ctgtgctgga aaccacaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg attcatc          177

<210> 2
<211> 195
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> misc_feature
<223> pEFTS

<220>
<221> misc_feature <222> (1)..(195)
<223> sequência promotora se nenhum outro promotor a jusante ocorre

```

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(178)
 <223> sequência promotora se um outro promotor está ligado a jusante

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (147)..(152)
 <223> região -10 putativa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (162)..(167)
 <223> região -10 putativa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (179)..(185)
 <223> sequência de ligação de ribossoma putativa

<400> 2

cccecacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcacgc ccgtgggggc tttttgggca	60
gccagcccg cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg	120
gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacataag	180
gaggatcgcc ccgta	195

<210> 3
 <211> 199
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> pEFTU

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(199)
 <223> sequência promotora se nenhum outro promotor a jusante ocorre

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(176)
 <223> sequência promotora se um outro promotor está ligado a jusante

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(41)
 <223> região -10 putativa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (63)..(68)
 <223> região -10 putativa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (92)..(97)

<223> região -10 putativa

<220>

<221> misc_feature

<222> (187)..(193)

<223> sequência de ligação de ribossoma putativa

<400> 3

ggccggttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa cgccgttgcc 60

cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct cagtcttcca 120

ggctgcttat cacagtgaag gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt agccaccacg 180

aagtccagga ggacataca 199

<210> 4

<211> 191

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> misc_feature

<223> pSOD

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(191)

<223> sequência promotora se nenhum outro promotor a jusante ocorre

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(173)

<223> sequência promotora se um outro promotor está ligado a jusante

<220>

<221> misc_feature

<222> (65)..(70)

<223> região -10 putativa

<220>

<221> misc_feature

<222> (86)..(92)

<223> região -10 putativa

<220>

<221> misc_feature

<222> (175)..(181)

<223> sequência de ligação de ribossoma putativa

<400> 4

(copiar a sequência da página 6 da listagem de sequência)

agctgccaat tattccgggc ttgtgaccgc ctacccgata aatagggtcgg ctgaaaaatt 60

tcgttgcaat atcaacaaaa aggcctatca ttgggaggtg tcgcaccaag tactttttgcg 120

aagcgccatc tgacggattt tcaaaagatg tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180

attttttacc c 191

<210> 5

<211> 52
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 5

ccccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 6
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 6

tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 7
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 7

gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 8
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 8

gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 9

gagagggcgcg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaa 34

<210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

 <400> 10

 gagagggcg cgcgtcaagt cgggtcaagcc acgc 34

 <210> 11
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo

 <400> 11

 tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggtc ccacgcgtca tatgactagt 60
 tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcy ttaattaaca attgggatcc 120
 tctagaccgc ggatttaaatt 140

 <210> 12
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo

 <400> 12

 gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60
 tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgc gcccgacgtc 120
 aggcctctcg agatttaaatt 140

 <210> 13
 <211> 4323
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Plasmídeo

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Plasmídeo pCLiK5MCS

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (457) .. (1248)
 <223> KanR

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3840) .. (4302)
 <223> PsacB (complementar)

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (2418)..(3839)
 <223> SacB (complementar)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1515)..(2375)
 <223> Ori-Ec (pMB) (complementar)

<400> 13

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctaggga	60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga	120
tttaaatacgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa	180
cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc	240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggtt	300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag	360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca	420
agatctgata aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac	480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca	540
atcggtctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt	600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg	660
tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga	720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct	780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg	840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcga a catcgcatcg agcagcacg tactcggatg	900
gaagccgggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc	960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgc atg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat	1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac	1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt	1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct	1200
cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc	1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca	1320
ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga	1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg	1440
gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc	1500
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgccggcgagc ggtatcagct	1560

cactcaaagg	cggtaatagc	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	1620
tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcggtttttc	1680
cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	1740
aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	1800
cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	1860
gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	1920
ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttata	cggtaaactat	1980
cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	2040
aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	2100
tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	2160
ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtgggtttt	2220
tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	2280
ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	2340
agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaagg	ccggccgcgg	ccgccatcgg	2400
cattttcttt	tgcgttttta	tttgtttaact	gttaattgtc	cttgttcaag	gatgctgtct	2460
ttgacaacag	atgttttctt	gcctttgatg	ttcagcagga	agctcggcgc	aaacgttgat	2520
tgtttgtctg	cgtagaatcc	tctgtttgtc	atatagcttg	taatcacgac	attgtttcct	2580
ttcgcttgag	gtacagcgaa	gtgtgagtaa	gtaaaggtta	catcgttagg	atcaagatcc	2640
atttttaaca	caaggccagt	tttgttcagc	ggcttgatat	ggccagttaa	agaattagaa	2700
acataacca	gcatgtaa	atcgtttagac	gtaatgccgt	caatcgtc	at	2760
cgggagtcag	tgaacaggta	ccatttgccg	ttcattttta	agacgttcgc	gcgttcaatt	2820
tcacctgtta	ctgtgttaga	tgcaatcagc	ggtttcatca	cttttttcag	tgtgtaatca	2880
tcgttttagct	caatcatacc	gagagcgccg	tttgctaact	cagccgtgcg	ttttttatcg	2940
ctttgcagaa	gtttttgact	ttcttgacgg	aagaatgatg	tgcttttgcc	atagtatgct	3000
ttgttaaata	aagattcttc	gccttggtag	ccatcttcag	ttccagtgtt	tgcttcaa	3060
actaagtatt	tgtggccttt	atcttctacg	tagtgaggat	ctctcagcgt	atggttgctg	3120
cctgagctgt	agttgccttc	atcgatgaac	tgctgtacat	tttgatacgt	ttttccgtca	3180
ccgtcaaaga	ttgatttata	atcctctaca	ccgttgatgt	tcaaagagct	gtctgatgct	3240
gatacgttaa	cttgtgcagt	tgctcagtgt	tgtttgccgt	aatgtttacc	ggagaaatca	3300
gtgtagaata	aacggatttt	tccgtcagat	gtaaatgtgg	ctgaacctga	ccattcttgt	3360
gtttgggtctt	ttaggataga	atcatttgca	tcgaatttgt	cgctgtcttt	aaagacgcgg	3420
ccagcgtttt	tccagctgtc	aatagaagtt	tcgccgactt	tttgatagaa	catgtaaatc	3480

```

gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatagcaa agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgcga cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660
tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcctttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcatac 3840
gttcatgtct ctttttttat gtactgtgtt agcggctctgc ttcttccagc cctcctgttt 3900
gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080
attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcattg 4200
gcataaagtt gcctttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
taatagttaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcgcccg ctcgatttaa 4320
atc 4323

```

```

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Iniciador

```

```

<400> 14

```

```

gcgcggtacc tagactcacc ccagtgtc 28

```

```

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Iniciador

```

```

<400> 15

```

```

ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

```

```

<210> 16
<211> 6349
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Plasmídeo

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> pCLik5MCS PmetA metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1727)..(2518)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Proteína Rep

<220>
<221> misc_feature
<222> (3791)..(4465)
<223> Ori-Ec (1113) (complementar)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2785)..(3645)
<223> Orfl

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(177)
<223> PmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (178)..(1311)
<223> metA
<400> 16

```

```

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag ctagactcac ccagtgctt      60
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg      120
tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccaccag aacaggcgggt tattttcatg      180
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa      240
gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta      300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac      360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac      420
tgcgatgatc gtaccaacgt catcggtggg tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg      480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta      540
aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggg      600
ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtaccaga aactgttggc      660
gcagctgctg ttcttgcatg ttctgcacgc gccagcgctt ggcaaatcgg cattcaatcc      720
gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc      780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgccacac cactaccgt      840

```

ggcgaactag	aaatcgacga	acgcttcggc	accaaagccc	aaaagaacga	aaaccactc	900
ggtccctacc	gcaagcccga	ccagcgcttc	gccgtggaat	cctacttgga	ctaccaagca	960
gacaagctag	tacagcgttt	cgacgccggc	tcctacgtct	tgctcaccga	cgccctcaac	1020
cgccacgaca	ttggtcgcga	ccgcggaggc	ctcaacaagg	cactcgaatc	catcaaagtt	1080
ccagtccttg	tcgcaggcgt	agataccgat	attttgtacc	cctaccacca	gcaagaacac	1140
ctctccagaa	acctgggaaa	tctactggca	atggcaaaaa	tcgtatcccc	tgctggccac	1200
gatgctttcc	tcaccgaaag	ccgccaaatg	gatcgcatcg	tgaggaactt	cttcagcctc	1260
atctccccag	acgaagacaa	cccttcgacc	tacatcgagt	tctacatcta	aactagttcg	1320
gacctaggga	tatcgtcgac	atcgatgctc	ttctgcgtta	attaacaatt	gggatcctct	1380
agacccggga	tttaaatacg	tagcgggctg	ctaaaggaag	cggaacacgt	agaaagccag	1440
tccgcagaaa	cggtgctgac	cccgatgaa	tgctagctac	tgggctatct	ggacaaggga	1500
aaaegcaagc	gcaaagagaa	agcaggtagc	ttgcagtggg	cttacatggc	gatagctaga	1560
ctgggcggtt	ttatggacag	caagcgaacc	ggaattgcca	gctggggcgc	cctctggtaa	1620
ggttgggaag	ccctgcaaag	taaactggat	ggctttcttg	ccgccaaagga	tctgatggcg	1680
caggggatca	agatctgatc	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	1740
tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	1800
acaacagaca	atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttcggg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	1860
ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	1920
goggctatcg	tggctggcca	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	1980
tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	2040
tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	2100
gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcgagcacg	2160
tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	2220
cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	cccgaaggcg	aggatctcgt	2280
cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	2340
attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	2400
ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgttcctctg	tgctttacgg	2460
tatcgccgct	cccgattcgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	2520
agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	2580
ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	2640
ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	cgctagcggc	2700
gcgccggccg	gcccgggtgtg	aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	2760

gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	2820
ggatatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	2880
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	2940
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	3000
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	3060
cgtgcgctct cctgttccga cctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc	3120
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtagggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt	3180
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgct gcgccttata	3240
cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	3300
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg	3360
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc	3420
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	3480
cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga	3540
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat	3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg	3660
ccgcgcaaag tcccgttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt	3720
aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga	3780
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt	3840
cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc	3900
acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct	3960
ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat	4020
cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag gacggcgcg	4080
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca	4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga	4200
aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc	4260
ggtgcccga ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgccag	4320
gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag	4380
cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt	4440
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc ccagtccta acctgggaga aagcgtcaa	4500
aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc	4560
tgttcgacac ccatcccgag ctgcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc	4620

gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg eagcaagacc cgcgacttcg 4680
 ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg 4740
 ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800
 gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
 ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920
 cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatatgatc cgggtgatgc 4980
 cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
 ccgcgttttc ggcgctgacc aggctttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
 tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
 ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280
 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340
 cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgatgatg agacggcttt 5400
 tcgccacgct ttgactgtgg gataaccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460
 caagggatcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggctg gaggaggccg 5520
 tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640
 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg 5700
 gaaagacca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
 acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 5820
 tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
 gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggctctc 6000
 tctcttggcc tcctttctag gtccggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060
 accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6120
 aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttccgcaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240
 gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300
 gtcggtgccc ctgggtgccc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 17
 gagactcgag agctgccaat tattccggg 29
 <210> 18
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador
 <400> 18
 cctgaaggcg cgagggtggg catgggtaaa aaatcctttc g 41
 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador
 <400> 19
 cccaccctcg cgccttcag 19
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador
 <400> 20
 ctgggtacat tgcggccc 18
 <210> 21
 <211> 6386
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Plasmideo
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> pCLiK5MCS PSODmeta
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1752)..(2543)
 <223> KanR
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4824)..(5945)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> misc_feature

<222> (2810)..(3670)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (3816)..(4490)

<223> orf1

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(196)

<223> Psod

<220>

<221> misc_feature

<222> (197)..(1330)

<223> met

<400> 21

tgcgagagctg ccaattattc cgggcttgtg acccgctacc cgataaatag gtcggctgaa	60
aaatttcggt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt	120
ttgcgaagcg ccattctgacg gattttcaaa agatgtatat gctcgggtgcg gaaacctacg	180
aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat	240
cgggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac gctgaaatcg cctatcaccg	300
ctgggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgttctca tcgaacacgc	360
cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc ccggcaaagc	420
catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcgggtggtt gcaacggttc	480
caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg ggtaatcgct tccccgccac	540
gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc gacgcactcg gcatcaccac	600
ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgccgc accctagagt gggccgcaat	660
gtaccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgagtt tctgcacgcg ccagcgctg	720
gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga	780
aggcaactac tacgaatccg gctgcaacc agccaccgga ctcggcgcg cccgacgcat	840
cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca	900
aaagaacgaa aaccactcg gtccctaccg caagcccgc cagcgcttcg ccgtggaatc	960
ctacttggtg taccaagcag acaagctagt acagcggttc gacgcgggt cctacgtctt	1020
gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac cgcggaggcc tcaacaaggc	1080
actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtacct	1140
ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat ctactggcaa tggcaaaaat	1200

cgatccccct	gtcggccacg	atgctttcct	caccgaaagc	cgccaaatgg	atcgcatcgt	1260
gaggaacttc	ttcagcctca	tctccccaga	cgaagacaac	ccttcgacct	acatcgagtt	1320
ctacatctaa	catatgacta	gttcggacct	agggatatcg	tcgacatcga	tgctcttctg	1380
cgttaattaa	caattgggat	cctctagacc	cgggatttaa	atcgctagcg	ggctgctaaa	1440
ggaagcggaa	cacgtagaaa	gccagtccgc	agaaacgggtg	ctgacccccg	atgaatgtca	1500
gctactgggc	tatctggaca	agggaaaacg	caagcgcaaa	gagaaagcag	gtagcttgca	1560
gtgggcttac	atggcgatag	ctagactggg	cggttttatg	gacagcaagc	gaaccggaat	1620
tgccagctgg	ggcgccctct	ggtaagggtg	ggaagccctg	caaagtaaac	tggtatggctt	1680
tcttgccgcc	aaggatctga	tggcgcaggg	gatcaagatc	tgatcaagag	acaggatgag	1740
gatcgtttcg	catgattgaa	caagatggat	tgcacgcagg	ttctccggcc	gcttggggtg	1800
agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaac	agacaatcgg	ctgctctgat	gccgccgtgt	1860
tccggctgtc	agcgcagggg	cgcccgggtc	tttttgtcaa	gaccgacctg	tccggtgccc	1920
tgaatgaact	gcaggacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	ggcggttcctt	1980
gcgcagctgt	gctcgacgtt	gtcactgaag	cgggaaggga	ctggctgcta	ttgggcgaag	2040
tgccggggca	ggatctcctg	tcattctacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	tccatcatgg	2100
ctgatgcaat	gcggcggctg	catacgcttg	atccggctac	ctgcccattc	gaccaccaag	2160
cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggctctgtc	gatcaggatg	2220
atctggacga	agagcatcag	gggctcgcgc	cagccgaact	gttcgccagg	ctcaaggcgc	2280
gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgctcgtg	cccatggcga	tgcttgcttg	ccgaatatca	2340
tggttgaaaa	tgcccgcttt	tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	gtggcggacc	2400
gctatcagga	catagcgttg	gctaccogtg	atattgctga	agagcttggc	ggcgaatggg	2460
ctgaccgctt	cctcgtgctt	tacggtatcg	ccgctcccga	ttcgcagcgc	atgcctttct	2520
atgcctttct	tgacgagttc	ttctgagcgg	gactctgggg	ttcgaaatga	ccgaccaagc	2580
gacgcccac	ctgccatcac	gagatttcga	ttccaccgcc	gccttctatg	aaagggttgg	2640
cttcggaatc	gttttcggg	acgcgggctg	gatgatcctc	cagcgcgggg	atctcatgct	2700
ggagtctctc	gcccacgcta	gcggcgcgcc	ggccggcccc	gtgtgaaata	ccgcacagat	2760
gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttcgccttc	ctcgctcact	gactcgctgc	2820
gctcggctcg	tcggctgcgg	cgagcggtat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	2880
ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	2940
ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	3000
atcacaaaaa	tcgacgtcga	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	3060

aggcggtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	3120
gatacctgtc	cgccctttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	3180
ggtatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	3240
ttcagccccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	3300
acgacttata	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	3360
gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	3420
ttggatatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	3480
ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	3540
gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	3600
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcattgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	3660
agatcctttt	aaaggccggc	cgcgggccg	caaagtcctg	ccttcgtgaa	attttcgtgc	3720
cgcgtagatt	tccgccaaaa	actttaacga	acgttcgtta	taatgggtgc	atgaccttca	3780
cgacgaagta	ctaaaattgg	cccgaatcat	cagctatgga	tctctctgat	gtcgcgctgg	3840
agtccgacgc	gctcgatgct	gcggtcgatt	taaaaacggg	gatcggattt	ttccgagctc	3900
tcgatacgac	ggacgcgcca	gcattcacgag	actggggccg	tgccgcgagc	gacctagaaa	3960
ctctcgtggc	ggatcttgag	gagctggctg	acgagctgcg	tgctcggcca	gcgccaggag	4020
gacgcacagt	agtggaggat	gcaatcagtt	gcgcctactg	cggtggcctg	attcctcccc	4080
ggcctgaccc	gcgaggacgg	cgcgcaaaat	attgctcaga	tgctgtgctg	gccgcagcca	4140
gccgcgagcg	cgccaacaaa	cgccacgccc	aggagctgga	ggcggttagg	tcgcaaatgg	4200
cgctggaagt	gcgtcccccg	agcgaaattt	tggccatggg	cgtcacagag	ctggaagcgg	4260
cagcgagaat	tatcgcgata	gtggcggtgc	ccgcaggcat	gacaaacatc	gtaaatgccg	4320
cgtttcgtgt	gccgtggccg	cccaggacgt	gtcagcgccg	ccaccacctg	caccgaatcg	4380
gcagcagcgt	cgcgcgtcga	aaaagcgcac	aggcggcaag	aagcgataag	ctgcacgaat	4440
acctgaaaaa	tggtgaacgc	cccgtgagcg	gtaactcaca	gggcgtcggc	taacccccag	4500
tccaaacctg	ggagaaagcg	ctcaaaaatg	actctagcgg	attcacgaga	cattgacaca	4560
ccggcctgga	aattttccgc	tgatctgttc	gacaccatc	ccgagctcgc	gctgcgatca	4620
cgtggctgga	cgagcgaaga	ccgcgcgcaa	ttcctcgtct	acctgggcag	agaaaatttc	4680
cagggcagca	agaccgcgca	cttcgccagc	gcttgatca	aagaccggga	cacggagaaa	4740
cacagccgaa	gttataccga	gttggttcaa	aatcgcttgc	ccggtgccag	tatgttgctc	4800
tgacgcacgc	gcagcacgca	gccgtgcttg	tcctggacat	tgatgtgccg	agccaccagg	4860
ccggcgggaa	aatcgagcac	gtaaaccccc	aggtctacgc	gattttggag	cgctgggcac	4920

gcctggaaaa agcgccagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 4980
tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040
tggctgcaac gaccgaggaa atgaccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100

ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 5160
acaatcgcg tggatcgcta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgac tcaggcacag 5220
aaaaaccta aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280
caagaaaagc cactgcgga gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340
ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgac gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 5400
gtgccgccc tgatgagac gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 5460
cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520
tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580
cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 5640
gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700
gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760
gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820
ccattgcagg ttggtttatg actggtgagg gagagactgg ctctggccg acaatcaatg 5880
aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg 5940
ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctctaggca 6000
gaaaacggtt cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggctcg gctgattgct 6060
cttgaagctc tctagggggg ctacacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 6120
cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc 6180
gaagccttgc cccgcgaaa tttcctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 6240
ctttcacct aaattcgaga gattggatto ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 6300
ccctgatcgc cttgcgacg ttggcgctcg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact 6360
tgatcagcgg ccgctcgatt taaatc 6386

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 22

gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg

29

<210> 23
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 23

cctgaaggcg cgagggtggg cattgtatgt cctcctggac

40

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 24

cccaccctcg cgccttcag

19

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 25

ctgggtacat tgcggccc

18

<210> 26
 <211> 6394
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo

<220>
 <221> misc_feature
 <223> pCLiK5MCS P EFTUmeth

<220>
 <221> misc_feature <222> (1772)..(2563)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4844)..(6965)
 <223> Proteína Rep

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2830)..(3690)
 <223> Ori-Ec (pMB) (complementar)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3836)..(4510)
 <223> Orf1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(216)
 <223> Peftu

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (217)..(1350)
 <223> metA

<400> 26

tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga	60
aatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct	120
gtgtgctcag tcttccaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga	180
aagtcgtagc caccacgaag tccaggagga catacaatgc ccaccctcgc gccttcaggt	240
caacttgaaa tccaagcgat cggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaaac	300
gctgaaatcg cctatcaccg ctgggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat	360
gtcgtttctca tcgaacacgc cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac	420
ttgctcggtc ccggcaaagc catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc	480
atcgggtggtt gcaacggttc caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg	540
ggtaatcgct tccccgccac gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc	600
gacgcactcg gcatcaccac ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgc	660
accctagagt gggccgcaat gtaccacagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgcagtt	720
tctgcacgcg ccagcgctg gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa	780
aacgaccacc actggcacga aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccaccgga	840
ctcggcgccg cccgacgcat cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa	900
cgcttcggca ccaaagccca aaagaacgaa aaccctctcg gtccctaccg caagcccgc	960
cagcgcttcg ccgtggaatc ctacttggaac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc	1020
gacgccggtt cctacgtctt gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac	1080
cgcggaggcc tcaacaaggc actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta	1140
gataccgata ttttgtagcc ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat	1200
ctactggcaa tggcaaaaat cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc	1260
cgccaaatgg atcgcatcgt gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac	1320
ccttcgacct acatcgagtt ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg	1380

tgcacatcga	tgctcttctg	cgtaaattaa	caattgggat	ectctagacc	cgggatttaa	1440
atcgctagcg	ggctgctaaa	ggaagcggaa	cacgtagaaa	gccagtccgc	agaaacggtg	1500
ctgacccccg	atgaatgtca	gctactgggc	tatctggaca	agggaaaacg	caagcgcaaa	1560
gagaaagcag	gtagcttgca	gtgggcttac	atggcgatag	ctagactggg	cggttttatg	1620
gacagcaagc	gaaccggaat	tgccagctgg	ggcgccctct	ggtaagggtg	ggaagccctg	1680
caaagtaaac	tggatggctt	tcttgccgcc	aaggatctga	tggcgagggg	gatcaagatc	1740
tgatcaagag	acaggatgag	gatcgtttctg	catgattgaa	caagatggat	tgcacgcagg	1800
ttctccggcc	gcttgggtgg	agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaac	agacaatcgg	1860
ctgctctgat	gccgccgtgt	tccggctgtc	agcgagggg	cgcccggttc	tttttgtcaa	1920
gaccgacctg	tccggtgccc	tgaatgaact	gcaggacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	1980
ggccacgacg	ggcgttcctt	gcgcagctgt	gctcgacgtt	gtcactgaag	cggaagggga	2040
ctggctgcta	ttgggcgaag	tgccggggca	ggatctcctg	tcattctcacc	ttgctcctgc	2100
cgagaaagta	tccatcatgg	ctgatgcaat	gcggcggtctg	catacgcttg	atccggctac	2160
ctgcccattc	gaccaccaag	cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	2220
cggctcttgc	gatcaggatg	atctggacga	agagcatcag	gggctcgcg	cagccgaact	2280
gttcgccagg	ctcaaggcgc	gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgctcgtga	cccatggcga	2340
tgcttgcttg	ccgaatatca	tgggtggaaaa	tggccgcttt	tctggattca	tcgactgtgg	2400
ccggctgggt	gtggcggaac	gctatcagga	catagcgttg	gctaccctg	atattgctga	2460
agagcttggc	ggcgaatggg	ctgaccgctt	cctcgctgctt	tacggtatcg	ccgctcccga	2520
ttcgcagcgc	atcgccttct	atcgccttct	tgacgagttc	ttctgagcgg	gactctgggg	2580
ttcgaaatga	ccgaccaagc	gacgcccac	ctgccatcac	gagatttcga	ttccaccgcc	2640
gccttctatg	aaaggttggg	cttcggaatc	gttttcggg	acgcgggctg	gatgatcctc	2700
cagcgcgggg	atctcatgct	ggagttcttc	gccacgcta	gcggcgcgcc	ggccggcccc	2760
gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttccgcttc	2820
ctcgctcact	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcggtat	cagctcactc	2880
aaaggcggta	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	2940
aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	3000
gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgtca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	3060
gacaggacta	taaagatacc	aggcgtttcc	ccctggaagc	tcctcgtgc	gctctcctgt	3120
tccgaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	3180
ttctcatagc	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	3240
ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	3300

tgagtccaac	ccggtaaagac	acgacttatac	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	3360
tagcagagcg	aggtatgtag	gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	3420
ctacactaga	aggacagtat	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	3480
aagagttggg	agctcttgat	ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	3540
ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	3600
tacgggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcatgagatt	3660
atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaaggccggc	cgcggccgcg	caaagtcccg	3720
ccttcgtgaaa	attttcgtgc	cgcgtgattt	tccgccaaaa	actttaacga	acgttcgtta	3780
taatggtgtc	atgaccttca	cgacgaagta	ctaaaattgg	cccgaatcat	cagctatgga	3840
tctctctgat	gtcgcgctgg	agtccgacgc	gctcgatgct	gccgtcgatt	taaaaacggg	3900
gatcggattt	ttccgagctc	tcgatacgac	ggacgcgcca	gcatacacgag	actgggccag	3960
tgcegcgagc	gacctagaaa	ctctcgtggc	ggatcttgag	gagctggctg	acgagctgcg	4020
tgctcggcca	gcgccaggag	gacgcacagt	agtggaggat	gcaatcagtt	gcgcctactg	4080
cgggtggcctg	attcctcccc	ggcctgaccc	gcgaggacgg	cgcgcaaaat	attgctcaga	4140
tgcggtgctg	gccgcagcca	gccgcgagcg	cgccaacaaa	cgccacgccg	aggagctgga	4200
ggcgggctagg	tcgcaaattg	cgttggaagt	gcgtcccccg	agcgaaattt	tggccatggg	4260
cgtcacagag	ctggaagcgg	cagcgagaat	tatcgcgatac	gtggcggtgc	ccgcaggcat	4320
gacaaacatac	gtaaatgccg	cgtttcgtgt	gccgtggccg	cccaggacgt	gtcagcgccg	4380
ccaccacctg	caccgaatcg	gcagcagcgt	cgcgcgtcga	aaaagcgcac	aggcggcaag	4440
aagcgataag	ctgcacgaat	acctgaaaaa	tgttgaacgc	cccgtgagcg	gtaactcaca	4500
gggcgtcggc	taacccccag	tccaaacctg	ggagaaagcg	ctcaaaaatg	actctagcgg	4560
attcacgaga	cattgacaca	ccggcctgga	aattttccgc	tgatctgttc	gacacccatac	4620
ccgagctcgc	gctgcgatca	cgtggctgga	cgagcgaaga	ccgccgcgaa	ttcctcgctc	4680
acctgggcag	agaaaatttc	cagggcagca	agaccgcgca	cttcgccagc	gcttggtatca	4740
aagaccgcga	cacggagaaa	cacagccgaa	gttataaccga	gttggttcaa	aatcgcttgc	4800
ccggtgccag	tatgttgctc	tgacgcacgc	gcagcacgca	gccgtgcttg	tcctggacat	4860
tgatgtgccg	agccaccagg	ccggcgggaa	aatcgagcac	gtaaaccccg	aggtctacgc	4920
gattttggag	cgctgggcac	gcctggaaaa	agcgcagct	tggatcggcg	tgaatccact	4980
gagcgggaaa	tgccagctca	tctggctcat	tgatccggtg	tatgccgcag	caggcatgag	5040
cagcccgaat	atgcgcctgc	tggtgcaaac	gaccgaggaa	atgaccgcgc	ttttcggcgc	5100
tgaccaggct	ttttcacata	ggctgagccg	tggccactgc	actctccgac	gatcccagcc	5160

gtaccgctgg catgccacag acaatcgctt ggatcgcccta gctgatctta tggaggttgc 5220
 tcgcatgatc tcaggcacag aaaaaccta aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg 5280
 acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct 5340
 tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt 5400
 cctctggact gctccagggc gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac 5460
 tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgagc 5520
 ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc 5580
 gccggactgt gaccgccaga cggattggcc gcgacgtgtg ccgcggtacg tcgctaaagg 5640
 ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct 5700
 ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag 5760
 tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa 5820
 agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg 5880
 ctctgtggcg acaatcaatg aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa 5940
 tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac ttccacgagg acgcgcgaaag cttcccagta 6000
 aatgtgccat ctcttaggca gaaaacgggt ccccgtagg gtctctctct tggcctcctt 6060
 tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctagggggg ctcacaccat aggcagataa 6120
 cgttccccac cggctcgctt cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc 6180
 actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagtctgtg 6240
 cacacccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga 6300
 aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgctcg tgccgctggt 6360
 tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6394

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 27

gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc

30

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 28

cctgaaggcg cgaggggtggg catgatgaat ccctccatga g 41

<210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 29

cccaccctcg cgccttcag 19

<210> 30
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 30

ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 31
 <211> 6372
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmideo

<220>
 <221> misc_feature
 <223> pCLiK5MCS PGroESmetA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1735)..(2526)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4807)..(5928)
 <223> Proteína Rep

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2793)..(3653)
 <223> Ori-EC (pMB) (complementar)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3799)..(4473)
 <223> Orf1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(179)
 <223> Pgro

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (180)..(1313)
 <223> metaA

<400> 31

agcggccttaa agtttggctg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgtctggc	60
actctcgggg gtagagtgcc aaatagggtt tttgacacac agttgttcac ccgcgacgac	120
ggctgtgctg gaaaccaca accggcacac acaaaatfff tctcatggag ggattcatca	180
tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcgggtgat gtctccaccg	240
aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt gaataccgcg	300
tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgcctcact ggagattcca	360
acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt	420
actgcgtgat ctgtaccaac gtcacgtgtg gttgcaacgg ttccaccgga cctgggtcca	480
tgcattccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg	540
taaacgccga aaaacaattc ctgcagcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg	600
gtggttccat ggggtgtgcc cgcaccctag agtgggcccgc aatgtacca gaaactgttg	660
gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaata ggcattcaat	720
ccgccccaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat	780
ccggctgcaa ccagccacc ggactcggcg ccgcccagc catcgccac ctcacctacc	840
gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaaagaac gaaaaccac	900
tcggctcccta ccgcaagccc gaccagcgct tcgccgtgga atcctacttg gactaccaag	960
cagacaagct agtacagcgt ttgcagccg gtcctacgt cttgtctacc gacgccctca	1020
accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaacaa ggcactcgaa tccatcaaag	1080
ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta cccctaccac cagcaagaac	1140
acctctccag aaacctggga aatctacttg caatggcaaa aatcgtatcc cctgtcggcc	1200
acgatgcttt cctcacgaa agccgccaaa tggatcgcat cgtgaggaac ttcttcagcc	1260
tcattctccc agacgaagac aacccttcga cctacatcga gttctacatc taacatatga	1320
ctagtctgga cctagggata tcgtcgacat cgatgctctt ctgcgttaat taacaattgg	1380
gacacctag acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag	1440
aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgacct cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg	1500
acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaa caggtagctt gcagtgggct tacatggcga	1560
tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc	1620

tctggttaagg	ttgggaagcc	ctgcaaagta	aactggatgg	ctttcttgcc	gccaaaggatc	1680
tgatggcgca	ggggatcaag	atctgatcaa	gagacaggat	gaggatcggt	tcgcatgatt	1740
gaacaagatg	gattgcacgc	aggttctccg	gccgcttggg	tggagaggct	attcggctat	1800
gactgggcac	aacagacaat	cggctgctct	gatgccgccg	tgttccggct	gtcagcgcag	1860
gggcgcccgg	ttctttttgt	caagaccgac	ctgtccgggtg	ccctgaatga	actgcaggac	1920
gaggcagcgc	ggctatcggtg	gctggccacg	acgggcgttc	cttgccgagc	tgtgctcgac	1980
gttgctactg	aagcgggaag	ggactggctg	ctattgggcg	aagtgccggg	gcaggatctc	2040
ctgtcatctc	accttgctcc	tgccgagaaa	gtatccatca	tggctgatgc	aatgcggcgg	2100
ctgcatacgc	ttgatccggc	tacctgccca	ttcgaccacc	aagcgaaaca	tcgcatcgag	2160
cgagcacgta	ctcggatgga	agccggctct	gtcgatcagg	atgatctgga	cgaagagcat	2220
caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	aggctcaagg	cgcgcatgcc	cgacggcgag	2280
gatctcgctg	tgacccatgg	cgatgcctgc	ttgccgaata	tcatggtgga	aaatggccgc	2340
ttttctggat	tcatcgactg	tggccggctg	ggtgtggcgg	accgctatca	ggacatagcg	2400
ttggctaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcgaat	gggctgaccg	cttcctcggtg	2460
ctttacggta	tcgccgctcc	cgattcgcag	cgcctcgctt	tctatcgctt	tcttgacgag	2520
ttctttctgag	cgggactctg	gggttcgaaa	tgaccgacca	agcgacgccc	aacctgccat	2580
cacgagattt	cgattccacc	gccgccttct	atgaaagggt	gggcttcgga	atcgttttcc	2640
gggacgccgg	ctggatgata	ctccagcgcg	gggatctcat	gctggagttc	ttcgcccacg	2700
ctagcggcgc	gccggccggc	ccggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	gagaaaatac	2760
cgcatacaggc	gctcttcgcg	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	2820
cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	2880
aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	2940
gcggttgctg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	3000
tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	3060
agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	3120
ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	3180
taggtcggtc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	3240
gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccgggtaa	gacacgactt	atcgccactg	3300
gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtg	tacagagttc	3360
ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	3420
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagaggt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	3480
gctggtagcg	gtgggttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	3540

caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	3600
taagggatth	tggatcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaaggcc	3660
ggccgcggcc	gcgcaaagtc	ccgcttcgtg	aaaattttcg	tgccgcgtga	ttttccgcca	3720
aaaactttta	cgaacgttcg	ttataatggg	gtcatgacct	tcacgacgaa	gtactaaaat	3780
tggcccgaat	catcagctat	ggatctctct	gatgtcgcgc	tggagtccga	cgcgctcgat	3840
gctgccgtcg	atttaaaaac	ggtgatcgga	tttttccgag	ctctcgatac	gacggacgcg	3900
ccagcatcac	gagactgggc	cagtgcgcgc	agcgacctag	aaactctcgt	ggcggatctt	3960
gaggagctgg	ctgacgagct	gcgtgctcgg	ccagcgccag	gaggacgcac	agtagtggag	4020
gatgcaatca	gttgcgcta	ctgcggtggc	ctgattcctc	cccggcctga	cccgcgagga	4080
cggcgcgcaa	aatattgctc	agatgcgtgt	cgtgccgcag	ccagccgcga	gcgcgccaac	4140
aaaegccacg	ccgaggagct	ggaggcggct	aggtcgcaaa	tggcgctgga	agtgcgtccc	4200
ccgagcgaaa	ttttggccat	ggtcgtcaca	gagctggaag	cggcagcgag	aattatcgcg	4260
atcgtggcgg	tgcccgcagg	catgacaaac	atcgtaaagt	ccgcgtttcg	tgtgccgtgg	4320
ccgcccagga	cgtgtcagcg	ccgccaccac	ctgcaccgaa	tcggcagcag	cgctcgcgct	4380
cgaaaaagcg	cacaggcggc	aagaagcgat	aagctgcacg	aatacctgaa	aaatgttgaa	4440
cgccccgtga	gcggtaactc	acagggcgtc	ggctaacccc	cagtccaaac	ctgggagaaa	4500
gcgctcaaaa	atgactctag	cggattcacg	agacattgac	acaccggcct	ggaaattttc	4560
cgctgatctg	ttcgacaccc	atcccagagct	cgcgctgcga	tcacgtggct	ggacgagcga	4620
agaccgccc	gaattcctcg	ctcacctggg	cagagaaaat	ttccagggca	gcaagacccg	4680
cgacttcgcc	agcgcttgga	tcaaagaccc	ggacacggag	aaacacagcc	gaagttatac	4740
cgagttgggt	caaaatcgct	tgcccgggtg	cagtatgttg	ctctgacgca	cgcgacgcac	4800
gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	ccgagccacc	aggccggcgg	gaaaatcgag	4860
cacgtaaacc	ccgaggtcta	cgcgattttg	gagcgctggg	cacgcctgga	aaaagcgcca	4920
gcttgatcg	gcgtgaatcc	actgagcggg	aaatgccagc	tcattctggct	cattgatccg	4980
gtgtatgccg	cagcaggcat	gagcagcccc	aatatgcgcc	tgctggctgc	aacgaccgag	5040
gaaatgaccc	gcgttttcgg	cgctgaccag	gctttttcac	ataggctgag	ccgtggccac	5100
tgcactctcc	gacgatccca	gccgtaccgc	tggcatgccc	agcacaatcg	cgtggatcgc	5160
ctagctgatc	ttatggaggt	tgctcgcgat	atctcaggca	cagaaaaacc	taaaaaacgc	5220
tatgagcagg	agttttctag	cggacgggca	cgtatcgaag	cggcaagaaa	agccactgcg	5280
gaagcaaaaag	cacttgccac	gcttgaagca	agcctgccga	gcgcgcgtga	agcgtctgga	5340
gagctgatcg	acggcgctcc	tgctcctctg	actgctccag	ggcgtgcgc	ccgtgatgag	5400

```

acggccttttc gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta 5460
aaagacacca agggatcatcg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggcggtcgga 5520
ggaggccgtg agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt 5580
gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtgcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag 5640
agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca 5700
gaacgctgga aagacccaaa cagtgagtac gcccagacac agcgagaaaa actagctaag 5760
tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt 5820
atgactgttg agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt 5880
agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca cttaaggctt gcgggcattg aacttccacg 5940
aggacgccga aagcttccca gtaaattgtc catctcgtag gcagaaaacg gttccccctg 6000
agggctctctc tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg 6060
gggctcacac cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac 6120
tgctcccaaa gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct tgccccgcgg 6180
aaatttcctc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaaag cttctttcac cctaaattcg 6240
agagattgga ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccctgat cgcccttgcg 6300
acgttggcgt cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgctcg 6360
atttaaattct cg 6372

```

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: BK 1849

<400> 32

```

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

```

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: BK 1862

<400> 33

atgccccaccc tcgcgcc

17

<211> 28

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Haf 26

<400> 34

gagaggatcc cccccacgac aatggaac

28

<210> 35

<211> 44

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Haf 27)

<400> 35

cctgaaggcg cgagggtggg cattacgggg cgatcctcct tatg

44

<210> 36

<211> 6389

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> pCLiK5MCS P EF-TS metA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1767)..(2558)

<223> KanR

<220>

<221> misc_feature

<222> (4839)..(5960)

<223> Proteína Rep

<220>

<221> misc_feature

<222> (2825)..(3685)

<223> Ori-Ec (FHB) (complementar)

<220>

<221> misc_feature

<222> (3831)..(4505)

<223> Orf1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1217)..(1411)
 <223> P EF-TS (complementar)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (83)..(1216)
 <223> metA (complementar)

<400> 36

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac cacgcgtcat atgactagtt	60
cggacctagg gatatcgtcg acttagatgt agaactcgat gtaggtcgaa gggttgtctt	120
cgtctgggga gatgaggctg aagaagttcc tcacgatgcg atccatttgg cggctttcgg	180
tgaggaaagc atcgtggccg acaggggata cgatttttgc cattgccagt agatttccca	240
ggtttctgga gaggtgttct tgctggtggt aggggtacaa aatatcggta tctacgcctg	300
cgacaaggac tggaactttg atggattcga gtgccttggt gaggcctccg cggtcgcgac	360
caatgtcgtg gcggttgagg gcgtcgggtga gcaagacgta ggagccggcg tcgaaacgct	420
gtactagctt gtctgcttgg tagtccaagt aggattccac ggogaagcgc tggtcgggct	480
tgcggtaggg accgagtggg ttttcgttct tttgggcttt ggtgccgaag cgttcgtcga	540
tttctagttc gccacggtag gtgaggtggg cgatgcgtcg ggcgggcgccg agtccggtgg	600
ctggggttga gccggattcg tagtagttgc cttcgtgcca gtggtggtcg ttttcaatcg	660
ccttaatttg ggcggattga atgccgattt gccaggcgct ggcgcggtga gaaactgcaa	720
gaacagcagc tgcgccaaca gtttctgggt acattgcggc ccactctagg gtgcggggcac	780
cacccatgga accaccaagt actgcggcga ccgtggtgat gccgagtgcg tcgaggaatt	840
gtttttcggc gtttacctga tcacgaatgg acgtggcggg gaagcgatta cccagaaat	900
ttccatctgg atgcatggag ccagggtccg tggaaccgtt gcaaccaccg atgacgttgg	960
tacagatcac gcagtaaata tcagtgttga tggctttgcc gggaccgagc aagtcagccc	1020
accaatcggc tgcgttgga tctccagtga gggcgtgttc gatgagaacg acattgctgc	1080
gtccttcttt atctacgcg tatttaccoc agcggtgata ggcgatttca gcgtttgtaa	1140
tgattgctcc ggcttcggtg gagacatcac cgatcgcttg gatttcaagt tgacctgaag	1200
gcgcgagggg gggcattacg gggcgatcct ccttatgtat ggataattaa tgctttacaa	1260
gcttaggtta gggcacagta gccctaccog cccgtctaaa aagtgatcgt acaggtattc	1320
agtcgattac gttgcgacac ggcgggctgg ctgccccaaa agccccacg gcgatgaaat	1380
tttaaaagtc aaagttccat tgctgtgggg gggatcctct agaccggga tttaaatcgc	1440
tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac	1500

cccgatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaagga aaacgcaagc gcaaagagaa	1560
agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag	1620
caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttggaag ccctgcaaag	1680
taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgac	1740
aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc	1800
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct	1860
ctgatgccgc cgtgttcggt ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg	1920
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca	1980
cgacggggtt tccttgccga gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc	2040
tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc tctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga	2100
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc	2160
cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc	2220
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg	2280
ccaggctcaa ggcgcgcgtg ccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct	2340
gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc	2400
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc	2460
ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgt tgctttacgg taccgccgt cccgattcgc	2520
agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga	2580
aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt	2640
ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg	2700
cggggatctc atgctggagt tcttcgccc cgttagcggc gcgcggccg gcccggtgtg	2760
aaataccgca cagatgcgtg aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttctcgc	2820
tactgactc gctgcgctcg gtggttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg	2880
cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag	2940
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc	3000
gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag	3060
gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga	3120
ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc	3180
atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg	3240
tgcacgaacc ccccgttcag ccgacccgct gcgccttata ccgtaactat cgtcttgagt	3300
ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca	3360

gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	3420
ctagaaggac	agtatttggg	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	3480
ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	3540
agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	3600
ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	3660
aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaagg	ccggccgcgg	ccgcgcaaag	tcccgtttcg	3720
tgaaaatttt	cgtgcccggt	gattttccgc	caaaaacttt	aacgaacggt	cgttataatg	3780
gtgtcatgac	cttcacgacg	aagtactaaa	attggcccga	atcatcagct	atggatctct	3840
ctgatgtcgc	gctggagtcc	gacgcgctcg	atgctgccgt	cgatttaaaa	acggtgatcg	3900
gatttttccg	agctctcgat	acgacggacg	cgccagcatc	acgagactgg	gccagtgcgg	3960
cgagcgacct	agaaactctc	gtggcggatc	ttgaggagct	ggctgacgag	ctgcgtgctc	4020
ggceagcgcc	aggaggacgc	acagtagtgg	aggatgcaat	cagttgcgcc	tactgcggtg	4080
gcctgattcc	tccccggcct	gaccgcgag	gacggcgcgc	aaaatattgc	tcagatgcgt	4140
gtcgtgccgc	agccagccgc	gagcgcgcca	acaaacgcca	cgccgaggag	ctggaggcgg	4200
ctaggctcga	aatggcgctg	gaagtgcgtc	ccccgagcga	aattttggcc	atggctcgtca	4260
cagagctgga	agcggcagcg	agaattatcg	cgatcgtggc	ggtgcccgca	ggcatgacaa	4320
acatcgtaaa	tgccgcgttt	cgtgtgccgt	ggccgcccag	gacgtgtcag	cgccgccacc	4380
acctgcaccg	aatcggcagc	agcgtcgcgc	gtcgaaaaag	cgcacaggcg	gcaagaagcg	4440
ataagctgca	cgaataacctg	aaaaatgttg	aacgccccgt	gagcggtaac	tcacagggcg	4500
tcggctaacc	cccagtccaa	acctgggaga	aagcgtctca	aaatgactct	agcggattca	4560
cgagacattg	acacaccggc	ctggaaattt	tccgctgata	tgttcgacac	ccatccccgag	4620
ctcgcgctgc	gatcacgtgg	ctggacgagc	gaagaccgcc	gcgaattcct	cgctcacctg	4680
ggcagagaaa	atttccaggg	cagcaagacc	cgcgacttcg	ccagcgcttg	gatcaaagac	4740
ccggacacgg	agaaacacag	ccgaagtatt	accgagttgg	ttcaaaatcg	cttgcccggg	4800
gccagtatgt	tgctctgacg	cacgcgcagc	acgcagccgt	gcttgtcctg	gacattgatg	4860
tgccgagcca	ccaggccggc	gggaaaatcg	agcacgtaaa	ccccgaggtc	tacgcgattt	4920
tggagcgctg	ggcacgcctg	gaaaaagcgc	cagcttggat	cggcgtgaat	ccactgagcg	4980
ggaaatgcca	gctcatctgg	ctcattgatc	cggtgtatgc	cgcagcaggc	atgagcagcc	5040
cgaatatgcg	cctgctgggt	gcaacgaccg	aggaaatgac	ccgcgttttc	ggcgctgacc	5100
aggctttttc	acataggctg	agccgtggcc	actgcactct	ccgacgatcc	cagccgtacc	5160
gctggcatgc	ccagcacaat	cgcgtggatc	gcctagctga	tcttatggag	gttgctcgca	5220

tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg 5280
 cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag 5340
 caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct 5400
 ggactgctcc agggcgtgcc gcccgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg 5460
 gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac caagggtcac cgagcctacg 5520
 agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg 5580
 actgtgaccg ccagacggat tggcgcgcac gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc 5640
 cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca 5700
 ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg gaaagacca aacagtgagt 5760
 acgcccagac acagcgagaa aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta 5820
 aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt tgagggagag actggctcgt 5880
 ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag 5940
 cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaagt 6000
 gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtaggggtct tctcttggcc tcctttctag 6060
 gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc 6120
 cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca aagatcttca aagccactgc 6180
 cgcgactgcc ttgcggaagc cttgccccgc ggaaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac 6240
 ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc 6300
 ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgccg 6360
 ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6389

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: BK 1753

<400> 37

ggatctagag ttctgtgaaa aacaccgtg

29

<210> 38

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: BK 1754

<400> 38

gcgactagtgc cccacaaat aaaaaacac

29

<210> 39

<211> 5156

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo

<220>

<221> misc_feature

<223> H247

<400> 39

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac cacgcgtcat atgactagtt	60
cggacctagg gatatcgctg acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatacct	120
ctagagttct gtgaaaaaca ccgtggggca gtttctgctt cgcggtgttt tttatttgtg	180
gggcactaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga	240
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga	300
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat	360
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt	420
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct	480
gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg	540
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg	600
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg	660
ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg	720
aggcagcgcg gctatcgtag ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg	780
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc	840
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc	900
tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc	960
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc	1020
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg	1080
atctcgctcg gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct	1140
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt	1200
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttctctgtgc	1260
tttacgggat cgcgctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt	1320

tctttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcca	acctgccatc	1380
acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	tcgttttccg	1440
ggacgcccgc	tggatgatcc	tccagcgcg	ggatctcatg	ctggagttct	tcgcccacgc	1500
tagcggcgcg	ccggccggcc	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	1560
gcatcaggcg	ctcttcgct	tctcgcctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	1620
ggcgagcgg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	1680
acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	1740
cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	1800
caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	1860
gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggataacctg	tccgccttcc	1920
tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gtcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	1980
aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	2040
ccttatcccg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggttaag	acacgactta	tcgccactgg	2100
cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatatgt	aggcggtgct	acagagttct	2160
tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atcttggtatc	tgcgctctgc	2220
tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	2280
ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	2340
aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	2400
aagggtatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	2460
gccgcggccg	cgcaaagtcc	cgcttcgtga	aaattttcgt	gccgcgtgat	tttccgcca	2520
aaactttaac	gaacgttcgt	tataatgggtg	tcatgacctt	cacgacgaag	tactaaaatt	2580
ggcccgaatc	atcagctatg	gatctctctg	atgtcgcgct	ggagtccgac	gcgctcgatg	2640
ctgcgctcga	tttaaaaacg	gtgatcggat	ttttccgagc	tctcgatacg	acggacgcgc	2700
cagcatcacg	agactgggcc	agtgcgcga	gcgacctaga	aactctcgtg	gcggatcttg	2760
aggagctggc	tgacgagctg	cgtgctcggc	cagcgccagg	aggacgcaca	gtagtggagg	2820
atgcaatcag	ttgcgcctac	tgcggtggcc	tgattcctcc	ccggcctgac	ccgcgaggac	2880
ggcgcgcaaa	atattgctca	gatgcgtgtc	gtgccgcagc	cagccgcgag	cgcgccaaca	2940
aacgccacgc	cgaggagctg	gaggcggcta	ggtcgcaaat	ggcgctggaa	gtgcgtcccc	3000
cgagcgaaat	tttggccatg	gtcgtcacag	agctggaagc	ggcagcgaga	attatcgcca	3060
tcgtggcggt	gcccgcaggc	atgacaaaca	tcgtaaatgc	cgcgtttcgt	gtgcgctggc	3120
cgcccaggac	gtgtcagcgc	cgccaccacc	tgcaccgaat	cggcagcagc	gtcgcgcgtc	3180

gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	aatgttgaac	3240
gccccgtgag	cggtaactca	cagggcgctc	gctaaccccc	agtccaaacc	tgggagaaaag	3300
cgctcaaaaa	tgactctagc	ggattcacga	gacattgaca	caccggcctg	gaaattttcc	3360
gctgatctgt	tcgacacca	tcccagagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	gacgagcgaa	3420
gaccgccgcg	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tccagggcag	caagacccgc	3480
gacttcgcca	gcgcttggat	caaagacccg	gacacggaga	aacacagccg	aagttatacc	3540
gagttggttc	aaaatcgctt	gcccgggtgcc	agtatgttgc	tctgacgcac	gcgcagcacg	3600
cagccgtgct	tgtcctggac	attgatgtgc	cgagccacca	ggccggcggg	aaaatcgagc	3660
acgtaaaccc	cgaggtctac	gcgatttttg	agcgctgggc	acgcctggaa	aaagcgccag	3720
cttggatcgg	cgtgaatcca	ctgagcggga	aatgccagct	catctggctc	attgatccgg	3780
tgtatgccgc	agcaggcatg	agcagcccga	atatgcgcct	gctggctgca	acgaccgagg	3840
aaatgacccg	cgttttcggc	gctgaccagg	ctttttcaca	taggctgagc	cgtggccact	3900
gcactctccg	acgatcccag	ccgtaccgct	ggcatgccca	gcacaatcgc	gtggatcgcc	3960
tagctgatct	tatggagggt	gctcgcatga	tctcaggcac	agaaaaacct	aaaaaacgct	4020
atgagcagga	gttttctagc	ggacggggcac	gtatcgaagc	ggcaagaaaa	gccactgcgg	4080
aagcaaaagc	acttgccacg	cttgaagcaa	gcctgccgag	cgccgctgaa	gcgtctggag	4140
agctgatcga	cggcgctccg	gtcctctgga	ctgctccagg	gcgtgccgcc	cgtgatgaga	4200
cggcttttcg	ccacgccttg	actgtgggat	accagttaaa	agcggctggg	gagcgcctaa	4260
aagacaccaa	gggtcatcga	gcctacgagc	gtgcctacac	cgtcgctcag	gcggctcgag	4320
gaggccgtga	gcctgatctg	ccgccggact	gtgaccgcca	gacggattgg	ccgcgacgtg	4380
tgcgcgggcta	cgtcgctaaa	ggccagccag	tcgtccctgc	tcgtcagaca	gagacgcaga	4440
gccagccgag	gcgaaaagct	ctggccacta	tgggaagacg	tggcggtaaa	aaggccgcag	4500
aacgctggaa	agacccaaac	agtgagtacg	cccagacaca	gcgagaaaaa	ctagctaagt	4560
ccagtcaacg	acaagctagg	aaagctaaag	gaaatcgctt	gaccattgca	ggttggttta	4620
tgactgttga	gggagagact	ggctcgtggc	cgacaatcaa	tgaagctatg	tctgaattta	4680
gcgtgtcacg	tcagaccgtg	aatagagcac	ttaaggctctg	cgggcattga	acttccacga	4740
ggacgccgaa	agcttcccag	taaatgtgcc	atctcgtagg	cagaaaacgg	ttcccccgta	4800
gggtctctct	cttggcctcc	tttctaggtc	gggctgattg	ctcttgaagc	tctctagggg	4860
ggctcacacc	ataggcagat	aacgttcccc	accggctcgc	ctcgtaagcg	cacaaggact	4920
gctcccaaag	atcttcaaag	ccactgccgc	gactgccttc	gcgaagcctt	gccccgcgga	4980
aatttcctcc	accgagttcg	tgcacacccc	tatgccaagc	ttctttcacc	ctaaattcga	5040
gagattggat	tcttaccgtg	gaaattcttc	gcaaaaatcg	tcccctgata	gcccttgcca	5100

cgttggcgctc ggtgcccgtg gttgcgcttg gcttgaccga cttgatcagc ggccgc 5156

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

<220>
 <223> Iniciador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: BK 1848

<400> 40

gagaactagt agctgccaat tattccggg 29

<210> 41
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: BK 1849

<400> 41

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 42
 <211> 6464
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmídeo

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: pG A4 (H344)

<400> 42

tcgattttaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag cacgcgtcat atgactagta 60

gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc taccgataa ataggtcggc tgaaaaattt 120

cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga 180

agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga 240

ttttttaccc atgccacccc tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga 300

tgtctccacc gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgccctatc accgctgggg 360

tgaataccgc gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaac acgccctcac 420

tggagattcc aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa	480
cactgatatt tactgctga tctgtaccaa cgtcatcggg ggttgcaacg gttccaccgg	540
acctggctcc atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat	600
tcgtgatcag gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcacat ccacggctgc	660
cgcagtactt ggtggttcca tgggtggtgc cgcacccta gagtggggccg caatgtaccc	720
agaaactggt ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaatt	780
cggcattcaa tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa	840
ctactacgaa tccggctgca acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgcacca	900
cctcacctac cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa	960
cgaaaaccca ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc ttcgccgtgg aatcctactt	1020
ggactaccaa gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac	1080
cgacgcctc aaccgccacg acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggcactcga	1140
atccatcaaa gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca	1200
ccagcaagaa cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc	1260
ccctgtcggc cacgatgctt tcctcaccca aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa	1320
cttcttcagc ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat	1380
ctaagtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agagttctgt	1440
gaaaaacacc gtggggcagt ttctgcttcg cgggtgtttt tatttggtgg gcaactagacc	1500
cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcgga cacgtagaaa gccagtccgc	1560
agaaacggtg ctgaccccg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg	1620
caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg	1680
cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg gccgcccctt ggtaagggtg	1740
ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg	1800
gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat	1860
tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaa	1920
agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgagggg cggccggttc	1980
tttttgtaaa gaccgacctg tccggtgcc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc	2040
tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag	2100
cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca gcatctcctg tcatctcacc	2160
ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggtg catacgcttg	2220
atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc	2280

ggatggaagc	cggctcttgtc	gatcaggatg	atctggacga	agagcatcag	gggctcgcgc	2340
cagccgaact	gttcgccagg	ctcaaggcgc	gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgtcgtga	2400
cccatggcga	tgcctgcttg	ccgaatatca	tgggtgaaaa	tggccgcttt	tctggattca	2460
tcgactgtgg	ccggctgggt	gtggcggacc	gctatcagga	catagcgttg	gctacccgtg	2520
atattgctga	agagcttggc	ggcgaatggg	ctgaccgctt	cctcgtgctt	tacggatatcg	2580
ccgctcccga	ttcgcagcgc	atcgccttct	atcgccttct	tgacgagttc	ttctgagcgg	2640
gactctgggg	ttcgaaatga	ccgaccaagc	gacgcccac	ctgccatcac	gagatttcga	2700
ttccaccgcc	gccttctatg	aaaggttggg	cttcggaatc	gttttcggg	acgccggctg	2760
gatgatcctc	cagcgcgggg	atctcatgct	ggagttcttc	gcccacgcta	gcggcgcgcc	2820
ggccggcccg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	2880
cttcgcgttc	ctcgtcact	gactcgtgc	gctcggctgt	tcggctgcgg	cgagcggtat	2940
cagetcactc	aaaggcggta	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	3000
acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	3060
ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	3120
ggcgaaaacc	gacaggacta	taaagatacc	aggcgtttcc	ccctggaagc	tcctcgtgc	3180
gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccc	gatacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	3240
gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	3300
ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	3360
actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	3420
gtaacaggat	tagcagagcg	aggatatgtag	gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	3480
ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	3540
ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcggtg	3600
gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	3660
tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	3720
tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaaggccggc	cgcggccgcg	3780
caaagtcccg	cttcgtgaaa	atcttcgtgc	cgcgtgattt	tccgccaaaa	actttaacga	3840
acgttcgtta	taatggtgtc	atgaccttca	cgacgaagta	ctaaaattgg	cccgaatcat	3900
cagctatgga	tctctctgat	gtcgcgctgg	agtccgacgc	gctcgatgct	gccgtcgatt	3960
taaaaacggg	gatcggattt	ttccgagctc	tcgatacgac	ggacgcgcca	gcatcacgag	4020
actggggccag	tgccgcgagc	gacctagaaa	ctctcgtggc	ggatcttgag	gagctggctg	4080
acgagctgcg	tgctcggcca	gcgccaggag	gacgcacagt	agtggaggat	gcaatcagtt	4140
gcgcctactg	cgggtggcctg	attcctcccc	ggcctgaccc	gcgaggacgg	cgcgcaaaat	4200

attgctcaga	tgcgtgtcgt	gccgcagcca	gccgcgagcg	cgccaacaaa	cgccacgccg	4260
aggagctgga	ggcggctagg	tcgcaaatgg	cgctggaagt	gcgtcccccg	agcgaaatth	4320
tggccatggt	cgtcacagag	ctggaagcgg	cagcgagaat	tatcgcgatc	gtggcgggtgc	4380
ccgcaggcat	gacaaacatc	gtaaatgccg	cgtttctgtg	gccgtggccg	cccaggacgt	4440
gtcagcgccg	ccaccacctg	caccgaatcg	gcagcagcgt	cgcgcgtcga	aaaagcgcac	4500
aggcggcaag	aagcgataag	ctgcacgaat	acctgaaaaa	tgttgaacgc	cccgtgagcg	4560
gtaactcaca	gggcgtcggc	taacccccag	tccaaacctg	ggagaaagcg	ctcaaaaatg	4620
actctagcgg	attcacgaga	cattgacaca	ccggcctgga	aattttccgc	tgatctgttc	4680
gacacccatc	ccgagctcgc	gctgcgatca	cgtggctgga	cgagcgaaga	ccgccgcgaa	4740
ttcctcgctc	acctgggcag	agaaaatttc	cagggcagca	agacccgcga	cttcgccagc	4800
gcttggatca	aagacccgga	cacggagaaa	cacagccgaa	gttataccga	gttggttcaa	4860
aatcgcttgc	ccggtgccag	tatgttgctc	tgacgcacgc	gcagcacgca	gccgtgcttg	4920
tcctggacat	tgatgtgccg	agccaccagg	ccggcgggaa	aatcgagcac	gtaaaccccg	4980
aggtctacgc	gattttggag	cgctgggcac	gcctggaaaa	agcgccagct	tggatcggcg	5040
tgaatccact	gagcgggaaa	tgccagctca	tctggctcat	tgatccggtg	tatgccgcag	5100
caggcatgag	cagcccgaat	atgcgcctgc	tggtctgaac	gaccgaggaa	atgaccgcgc	5160
ttttcggcgc	tgaccaggct	ttttcacata	ggctgagccg	tggccactgc	actctccgac	5220
gatcccagcc	gtaccgctgg	catgcccagc	acaatcgctg	ggatcgcta	gctgatctta	5280
tggagggttg	tcgcatgata	tcaggcacag	aaaaaccta	aaaacgctat	gagcaggagt	5340
tttctagcgg	acgggcacgt	atcgaagcgg	caagaaaagc	cactgcggaa	gcaaaagcac	5400
ttgccacgct	tgaagcaagc	ctgcgagcgc	ccgctgaagc	gtctggagag	ctgatcgacg	5460
gcgtccgtgt	cctctggact	gctccagggc	gtgccgcccg	tgatgagacg	gcttttcgcc	5520
acgctttgac	tgtgggatac	cagttaaaaag	cggtcgttga	gcgcctaaaa	gacaccaagg	5580
gtcatcgagc	ctacgagcgt	gcctacaccg	tcgctcaggc	ggtcggagga	ggccgtgagc	5640
ctgatctgcc	gccggactgt	gaccgccaga	cggattggcc	gcgacgtgtg	cgcggtacg	5700
tcgctaaagg	ccagccagtc	gtccctgctc	gtcagacaga	gacgcagagc	cagccgaggc	5760
gaaaagctct	ggccactatg	ggaagacgtg	gcggtaaaaa	ggccgcagaa	cgctggaaaag	5820
acccaaacag	tgagtacgcc	cgagcacagc	gagaaaaact	agctaagtcc	agtcaacgac	5880
aagctaggaa	agctaaagga	aatcgcttga	ccattgcagg	ttggtttatg	actgttgagg	5940
gagagactgg	ctcgtggccg	acaatcaatg	aagctatgtc	tgaatttagc	gtgtcacgtc	6000
agaccgtgaa	tagagcactt	aaggtctgcg	ggcattgaac	ttccacgagg	acgccgaaaag	6060

cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacggtt ccccgtagg gtctctctct 6120
 tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctagggggg ctcacaccat 6180
 aggcagataa cgttccccac cggtcgcct cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat 6240
 cttcaaagcc actgccgga ctgccttcgc gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac 6300
 cgagtctgtg cacacccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc 6360
 ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc ccttgcgacg ttggcgtcgg 6420
 tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6464

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: BK 1695

<400> 43

gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Haf16

<400> 44

gagaactagt gtggctacga ctttcgcagc 30

<210> 45

<211> 6604

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: pClik5MCS PefTuPsod metaA (H473)

<400> 45

tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga 60

aaatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct	120
gtgtgctcag tcttcaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga	180
aagtcgtagc cacactagta gctgccattt attccgggct tgtgaccgcg taccgataa	240
ataggtcggc tgaaaaattt cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt	300
cgcaccaagt acttttgca agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg	360
tgcggaaacc tacgaaagga ttttttacc atgcccacc tcgcgccttc aggtcaactt	420
gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc gaagccggag caatcattac aaacgctgaa	480
atcgccatc accgctgggg tgaataccgc gtagataaag aaggacgcag caatgtcgtt	540
ctcatcgaac acgccctcac tggagattcc aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc	600
ggtcccgga aagccatcaa cactgatatt tactgcgtga tctgtacca cgtcatcggg	660
ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc atgcatccag atggaaattt ctggggtaat	720
cgtttccccg ccacgtccat tcgtgatcag gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca	780
ctcgccatca ccacggtcgc cgcagtactt ggtggttcca tgggtggtgc ccgcacccta	840
gagtgggccc caatgtacc agaaactgtt ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca	900
cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa tccgccaaa ttaaggcgat tgaaaacgac	960
caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa tccggctgca acccagccac cggactcggc	1020
gccgcccga gcatcgcca cctcacctac cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc	1080
ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca ctcggtccct accgcaagcc cgaccagcgc	1140
ttcgccgtgg aatcctactt ggactacca gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc	1200
ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga	1260
ggcctcaaca aggcactcga atccatcaaa gttccagtcc ttgtcgcagg cgtagatacc	1320
gatattttgt acccctacca ccagcaagaa cacctctcca gaaacctggg aaatctactg	1380
gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc cacgatgctt tcctcaccga aagccgcaa	1440
atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg	1500
acctacatcg agttctacat ctaagtgcac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt	1560
gggatccctc agagttctgt gaaaaacacc gtggggcagt ttctgcttcg cgggtgtttt	1620
tatttggtgg gcactagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcgga	1680
cacgtagaaa gccagtccgc agaaacgggtg ctgaccccg atgaatgtca gctactgggc	1740
tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac	1800
atggcgatag ctgactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg	1860
ggcgccctct ggtaagggtt ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc	1920
aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg	1980

catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt	2040
cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc	2100
agcgcagggg cgcccgggtt tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact	2160
gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtgggt ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt	2220
gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca	2280
ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat	2340
gcggcggctg catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg	2400
catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg atctggacga	2460
agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gtctgccagg ctcaaggcgc gcatgccga	2520
cggcgaggat ctctctgtga cccatggcga tgcttcttg ccgaatatca tggtggaana	2580
tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga	2640
catagcgctg gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaaatgg ctgaccgctt	2700
cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttgcagcgc atcgcttct atcgcttct	2760
tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac	2820
ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggttgg cttcggaatc	2880
gttttccggg acgccggctg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagtcttc	2940
gccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccgt gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag	3000
aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc gctcggtcgt	3060
tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc	3120
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa	3180
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa	3240
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc	3300
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc	3360
cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag	3420
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga	3480
ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc acgacttctc	3540
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac	3600
agagttcttg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg	3660
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaa	3720
aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa	3780
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa	3840

ctcacgttaa	gggatttttg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	3900
aaaggccggc	cgcgcccgcg	caaagtcccc	cttcgtgaaa	attttcgtgc	cgcgtagatt	3960
tccgccaaaa	actttaacga	acgttcgtta	taatggtgtc	atgaccttca	cgacgaagta	4020
ctaaaattgg	cccgaatcat	cagctatgga	tctctctgat	gtcgcgctgg	agtccgacgc	4080
gctcgatgct	gccgtcgatt	taaaaacggt	gatcggattt	ttccgagctc	tcgatacgac	4140
ggacgcgcca	gcatcacgag	actgggccag	tgccgcgagc	gacctagaaa	ctctcgtggc	4200
ggatcttgag	gagctggctg	acgagctgcg	tgctcggcca	gcgccaggag	gacgcacagt	4260
agtggaggat	gcaatcagtt	gcgcctactg	cggtggcctg	attcctcccc	ggcctgaccc	4320
gcgaggacgg	cgcgcaaaat	attgctcaga	tgctgtctgt	gccgcagcca	gccgcgagcg	4380
cgccaacaaa	cgccacgccg	aggagctgga	ggcggctagg	tcgcaaattg	cgctggaagt	4440
gcgtcccccg	agcgaaattt	tggccatggt	cgtcacagag	ctggaagcgg	cagcgagaat	4500
tatcgcgatc	gtggcggtgc	ccgcaggcat	gacaaacatc	gtaaatgccg	cgtttcgtgt	4560
gccgtggccg	cccaggacgt	gtcagcgccg	ccaccacctg	caccgaatcg	gcagcagcgt	4620
cgcgcgtcga	aaaagcgcac	aggcggcaag	aagcgataag	ctgcacgaat	acctgaaaaa	4680
tgttgaacgc	cccgtgagcg	gtaactcaca	gggcgtcggc	taacccccag	tccaaacctg	4740
ggagaaagcg	ctcaaaaatg	actctagcgg	attcacgaga	cattgacaca	ccggcctgga	4800
aattttccgc	tgatctgttc	gacacccatc	ccgagctcgc	gctgcgatca	cgtggctgga	4860
cgagcgaaga	ccgccgcgaa	ttcctcgctc	acctgggcag	agaaaatttc	cagggcagca	4920
agaccgcgca	cttcgccagc	gcttggatca	aagaccgga	cacggagaaa	cacagccgaa	4980
gttataccga	gttggttcaa	aatcgcttgc	ccggtgccag	tatgttgctc	tgacgcacgc	5040
gcagcacgca	gccgtgcttg	tcctggacat	tgatgtgccg	agccaccagg	ccggcgggaa	5100
aatcgagcac	gtaaaccccg	aggtctacgc	gattttggag	cgctgggcac	gcctggaaaa	5160
agcgccagct	tggatcggcg	tgaatccact	gagcgggaaa	tgccagctca	tctggctcat	5220
tgatccggtg	tatgccgcag	caggcatgag	cagcccgaat	atgcgcctgc	tggtgcaac	5280
gaccgaggaa	atgaccgcg	ttttcggcgc	tgaccaggct	ttttcacata	ggctgagccg	5340
tggccactgc	actctccgac	gatcccagcc	gtaccgctgg	catgcccagc	acaatcgcgt	5400
ggatcgccta	gctgatctta	tggaggttgc	tcgcatgata	tcaggcacag	aaaaacctaa	5460
aaaacgctat	gagcaggagt	tttctagcgg	acgggcacgt	atcgaagcgg	caagaaaagc	5520
cactgcggaa	gcaaaagcac	ttgccacgct	tgaagcaagc	ctgccgagcg	ccgctgaagc	5580
gtctggagag	ctgatcgacg	gcgtccgtgt	cctctggact	gtccagggc	gtgccgcccc	5640
tgatgagacg	gcttttcgcc	acgctttgac	tgtgggatac	cagttaaaag	cggctggtga	5700

gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgcgagc ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc 5760
 ggctcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga cggattggcc 5820
 gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga 5880
 gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa 5940
 ggccgcagaa cgctggaaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact 6000
 agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg 6060
 ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctcggtggccg acaatcaatg aagctatgtc 6120
 tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac 6180
 ttccacgagg acgccgaaaag cttcccagta aatgtgccat ctcgtaggca gaaaacgggt 6240
 cccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc 6300
 tctagggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggtcgcct cgtaagcgca 6360
 caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgcga ctgccttcgc gaagccttgc 6420
 cccgcggaaa tttcctccac cgagtctgtg cacacccta tgccaagctt ctttcaccct 6480
 aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc 6540
 ccttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg 6600
 ccgc 6604

<210> 46

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Haf64

<400> 46

gagaactagt ggccgttacc ctgcgaatg 29

<210> 47

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Haf65

<400> 47

gcgcgagggt gggcattgta tgtcctcctg gacttc 36

<210> 48

<211> 17

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: BK1862)

<400> 48

atgcccaccc tcgcgcc

17

<210> 49
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: BK1849I

<400> 49

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag

32

<210> 50
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<220>
 <221> raise_feature
 <223> designação interna: BK 1697

<400> 50

gagactcgag agctgccaat tattccggg

29

<210> 51
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: Haf17)

<400> 51

gagaactagt taggtttccg caccgagc

28

<210> 52

<211> 6609

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: pCLiK5MCS Psod Pert metaA (HS05)

<400> 52

tcgattttaa	tctcgagagc	tgccaattat	tccgggcttg	tgacccgcta	cccgataaat	60
aggtcggctg	aaaaatttcg	ttgcaatata	aacaaaaagg	cctatcattg	ggaggtgtcg	120
caccaagtac	ttttgcgaag	cgccatctga	cggattttca	aaagatgtat	atgctcgggtg	180
cggaaaccta	actagtggcc	gttaccctgc	gaatgtccac	agggtagctg	gtagtttgaa	240
aatcaacgcc	gttgcccgta	ggattcagta	actggcacat	tttgtaatgc	gctagatctg	300
tgtgctcagt	cttccaggct	gcttatcaca	gtgaaagcaa	aaccaattcg	tggctgcgaa	360
agtcgtagcc	accacgaagt	ccaggaggac	atacaatgcc	caccctcgcg	ccttcagggtc	420
aacttgaaat	ccaagcgatc	ggtgatgtct	ccaccgaagc	cggagcaatc	attacaaacg	480
ctgaaatcgc	ctatcacccg	tgggggtgaat	accgcgtaga	taaagaagga	cgcagcaatg	540
tcgttctcat	cgaacacgcc	ctcactggag	attccaacgc	agccgattgg	tgggctgact	600
tgctcgggtc	cggcaaagcc	atcaaacactg	atatttactg	cgtgatctgt	accaacgtca	660
tcggtgggtg	caacgggttc	accggacctg	gtcccatgca	tccagatgga	aatttctggg	720
gtaatcgctt	ccccgccacg	tccattcgtg	atcaggtaaa	cgccgaaaaa	caattcctcg	780
acgcactcgg	catcaccacg	gtcgccgcag	tacttggtgg	ttccatgggt	ggtgcccgcg	840
ccctagagtg	ggccgcaatg	taccagaaaa	ctggtggcgc	agctgctgtt	cttgcagttt	900
ctgcacgcgc	cagcgccttg	caaatcggca	ttcaatccgc	ccaaattaag	gcgattgaaa	960
acgaccacca	ctggcacgaa	ggcaactact	acgaatccgg	ctgcaacca	gccaccggac	1020
tgggcgccgc	ccgacgcata	gccacactca	cctaccgttg	cgaactagaa	atcgacgaac	1080
gcttcggcac	caaagcccaa	aagaacgaaa	accactcgg	tccctaccgc	aagcccgacc	1140
agcgcttcgc	cgtggaatcc	tacttggtg	accaagcaga	caagctagta	cagcgtttcg	1200
acgcgcggctc	ctacgtcttg	ctcaccgacg	ccctcaaccg	ccacgacatt	ggtcgcgacc	1260
gcggaggcct	caacaaggca	ctcgaatcca	tcaaagttcc	agtccttgtc	gcaggcgtag	1320
ataccgatata	tttgtacccc	taccaccagc	aagaacacct	ctccagaaac	ctgggaaatc	1380
tactggcaat	ggcaaaaaatc	gtatcccttg	tgggccacga	tgctttcttc	accgaaagcc	1440
gccaaatgga	tgcgacgtg	aggaacttct	tcagcctcat	ctccccagac	gaagacaacc	1500
cttcgacctta	catcgagttc	tacatctaag	tgcacatcga	tgctcttctg	cgtttaattaa	1560
caattgggat	cctctagagt	tctgtgaaaa	acaccgtggg	gcagtttctg	cttcgcgggtg	1620

ttttttat	gtggggcact	agacccggga	tttaa	atcgc	tagcgggctg	ctaaaggaag	1680
cggaacacgt	agaaagccag	tccgcagaaa	cggtgctgac	cccggatgaa	tgtcagctac		1740
tgggctatct	ggacaaggga	aaacgcaagc	gcaaagagaa	agcaggtagc	ttgcagtggg		1800
cttacatggc	gatagctaga	ctggggcggtt	ttatggacag	caagcgaacc	ggaattgcc		1860
gctggggcgc	cctctggtaa	ggttgggaag	ccctgcaaag	taaactggat	ggctttcttg		1920
ccgccaagga	tctgatggcg	caggggatca	agatctgac	aagagacagg	atgaggatcg		1980
tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg		2040
ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg		2100
ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat		2160
gaactgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	tggctggcca	cgacgggctg	tccttgcgca		2220
gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg		2280
gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat		2340
gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcga		2400
catcgcacgc	agcgagcacg	tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg		2460
gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg		2520
cccgcggcgc	aggatctcgt	cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatggtg		2580
gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat		2640
caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac		2700
cgttctctcg	tgctttacgg	tatcgccgct	cccgatcgc	agcgcatcgc	cttctatcgc		2760
cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc		2820
ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg		2880
gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt		2940
tcttcgccca	cgtagcggc	gcgccggcgc	gcccgggtgtg	aaataccgca	cagatgcgta		3000
aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	gcttctctgc	tactgactc	gctgcgctcg		3060
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca		3120
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac		3180
cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac		3240
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagac	gactataaag	ataccaggcg		3300
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac		3360
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat		3420
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag		3480

cccgaccgct	gcgcccttate	cggttaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	3540
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	3600
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	3660
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	3720
aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	3780
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	3840
gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatt	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	3900
cttttaaagg	ccggccgctg	ccgcgcaaag	tcccgtttcg	tgaaaatttt	cgtgccgcgt	3960
gattttccgc	caaaaacttt	aacgaacggt	cgttataatg	gtgtcatgac	cttcacgacg	4020
aagtactaaa	attggcccga	atcatcagct	atggatctct	ctgatgtcgc	gctggagtcc	4080
gacgcgctcg	atgctgccgt	cgatttaaaa	acggtgatcg	gatttttccg	agctctcgat	4140
acgacggacg	cgccagcatc	acgagactgg	gccagtgccg	cgagcgacct	agaaaactctc	4200
gtggcggatc	ttgaggagct	ggctgacgag	ctgcgtgctc	ggccagcgcc	aggaggacgc	4260
acagtagtgg	aggatgcaat	cagttgcgcc	tactgcggtg	gcctgattcc	tccccggcct	4320
gacccgcgag	gacggcgctc	aaaatattgc	tcagatgcgt	gtcgtgccgc	agccagccgc	4380
gagcgcgcca	acaaacgcca	cgccgaggag	ctggaggcgg	ctaggtcgca	aatggcgctg	4440
gaagtgcgtc	ccccgagcga	aattttggcc	atggtcgtca	cagagctgga	agcggcagcg	4500
agaattatcg	cgatcgtggc	ggtgcccgca	ggcatgacaa	acatcgtaaa	tgccgcgttt	4560
cgtgtgcgct	ggccgcccag	gacgtgtcag	cgccgccacc	acctgcaccg	aatcggcagc	4620
agcgtcgcgc	gtcgaaaaag	cgcacaggcg	gcaagaagcg	ataagctgca	cgaataacctg	4680
aaaaatgttg	aacgccccgt	gagcggtaac	tcacagggcg	tcggctaacc	cccagtccaa	4740
acctgggaga	aagcgtcaa	aaatgactct	agcggattca	cgagacattg	acacaccggc	4800
ctggaaattt	tccgctgac	tgttcgacac	ccatcccag	ctcgcgctgc	gatcacgtgg	4860
ctggacgagc	gaagaccgcc	gcgaattcct	cgctcacctg	ggcagagaaa	atttccaggg	4920
cagcaagacc	cgcgacttcg	ccagcgcttg	gatcaaagac	ccggacacgg	agaaacacag	4980
ccgaagttaa	accgagttgg	ttcaaaatcg	cttgcccggg	gccagtatgt	tgtctctgacg	5040
cacgcgcagc	acgcagccgt	gcttgtcctg	gacattgatg	tgccgagcca	ccaggccggc	5100
gggaaaatcg	agcacgtaaa	ccccgaggtc	tacgcgattt	tgagcgcgtg	ggcacgcctg	5160
gaaaaagcgc	cagcttggat	cggcgtgaat	ccactgagcg	ggaaatgcca	gctcatctgg	5220
ctcattgatc	cggtgtatgc	cgcagcaggc	atgagcagcc	cgaatatgcg	cctgctgggt	5280
gcaacgaccg	aggaaatgac	ccgcgttttc	ggcgtgacc	aggctttttc	acataggctg	5340
agccgtggcc	actgcactct	ccgacgatcc	cagccgtacc	gctggcatgc	ccagcacaat	5400

```

cgcggtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa 5460
cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga 5520
aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct 5580
gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgctc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgcc 5640
gcccgtgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct 5700
ggtgagcgcc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct 5760
caggcggtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat 5820
tggccgcgac gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag 5880
acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt 5940
aaaaaggccg cagaacgctg gaaagaccca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa 6000
aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt 6060
gcaggttggt ttatgactgt tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct 6120
atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat 6180
tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaattgt gccatctcgt aggcagaaaa 6240
cggttcccc gtagggctct tctcttgcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga 6300
agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa 6360
gcgcacaagg actgctcca aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc 6420
cttgccccgc ggaaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc 6480
accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg 6540
atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgccg ttggcttgac cgacttgatc 6600
agcggccgc 6609

```

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: BK1701

<400> 53

```

gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc

```

30

<210> 54

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Haf018

<400> 54

gagaactagt attttgtgtg tgccggttgt g

31

<210> 55

<211> 6583

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo

<220>

<221> misc_feature

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

<400> 55

tcgatttaaa tctcgagcgg cttaaagttt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa 60

cagttgagtg ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg 120

ttcaccgcg acgacggctg tgctggaac ccacaaccgg cacacacaaa atactagtag 180

ctgccaatta ttccgggctt gtgaccgcgt acccgataaa taggtcggct gaaaaatttc 240

gttgcaatat caacaaaaag gcctatcatt gggagggtgc gcaccaagta cttttgcgaa 300

gcgccatctg acggattttc aaaagatgta tatgctcggt gcggaaacct acgaaaggat 360

tttttaccca tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat 420

gtctccaccg aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggt 480

gaataccgcg tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact 540

ggagattcca acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac 600

actgatattt actgcgtgat ctgtaccaac gtcacgggtg gttgcaacgg ttccaccgga 660

cctgggtcca tgcatccaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc cacgtccatt 720

cgtgatcagg taaacgccga aaaacaattc ctgcacgcac tcggcatcac cacggtcgcc 780

gcagtacttg gtggttccat ggggtgtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtacca 840

gaaactgttg gcgcagctgc tggtcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaata 900

ggcattcaat ccgcccacaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac 960

tactacgaat ccggctgcaa ccagccacc ggactcggcg ccgcccgcac catcgcccac 1020

ctcacctacc gtggcgaaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaagaac 1080

gaaaacccac	tcggtcccta	ccgcaagccc	gaccagcgct	tcgccgtgga	atcctacttg	1140
gactaccaag	cagacaagct	agtacagcgt	ttcgacgccg	gctcctacgt	cttgctcacc	1200
gacgccctca	accgccacga	cattggctgc	gaccgcggag	gcctcaacaa	ggcactcgaa	1260
tccatcaaag	ttccagtcct	tgctgcaggc	gtagataccg	atattttgta	cccctaccac	1320
cagcaagaac	acctctccag	aaacctggga	aatctactgg	caatggcaaa	aatcgtatcc	1380
cctgtcggcc	acgatgcttt	cctcaccgaa	agccgccaaa	tggatcgcat	cgtgaggaaac	1440
ttcttcagcc	tcctctcccc	agacgaagac	aacccttcga	cctacatcga	gttctacatc	1500
taagtgcaca	tcgatgctct	tctgcgttaa	ttaacaattg	ggatcctcta	gagttctgtg	1560
aaaaacaccg	tggggcagtt	tctgcttcgc	ggtgtttttt	atgtgtgggg	cactagaccc	1620
gggattttaa	tcgctagcgg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaag	ccagtccgca	1680
gaaacgggtg	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	1740
aagegcaaag	agaaagcagg	tagcttgcag	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	1800
ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgcctctg	gtaaggttgg	1860
gaagccctgc	aaagtaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgcagggg	1920
atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	1980
gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	2040
gacaatcggc	tgctctgatg	ccgccgtgtt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	2100
ttttgtcaag	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggct	2160
atcgtggctg	gccacgacgg	gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	2220
gggaagggac	tggctgctat	tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	2280
tgctcctgcc	gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggctgc	atacgcttga	2340
tccggtacc	tgccattcgg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	2400
gatggaagcc	ggtcttgctg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	2460
agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgac	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	2520
ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	ctggattcat	2580
cgactgtggc	cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctgta	2640
tattgctgaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	2700
cgtccccgat	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	2760
actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccaccc	tgccatcacg	agatttcgat	2820
tccaccgccg	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	cgccggctgg	2880
atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccacgctag	cggcgcgccg	2940
gccggccccg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgctc	3000

ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcgggtatc	3060
agctcactca	aaggcggtaa	tacggttata	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	3120
catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	3180
tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagagggtg	3240
gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcggtcg	3300
ctctcctggt	cgcacctgc	cgcttacccg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	3360
cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	tcgttcgctc	3420
caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccgt	tcagcccgac	cgctgcgcct	tatccggtaa	3480
ctatcgcttt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	3540
taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cgggtgctaca	gagttcttga	agtgggtggc	3600
taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	3660
cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaacaa	accaccgctg	gtagcggtgg	3720
tttttttggt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	3780
gatcttttct	acggggtctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	3840
catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	gatcctttta	aaggccggcc	gcggccgcgc	3900
aaagtcccg	ttcgtgaaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	ccgccaaaaa	ctttaacgaa	3960
cgttcgttat	aatggtgtca	tgaccttcac	gacgaagtac	taaaattggc	ccgaatcatc	4020
agctatggat	ctctctgatg	tcgcgctgga	gtccgacgcg	ctcgatgctg	ccgtcgattt	4080
aaaaacggtg	atcggtttt	tccgagctct	cgatacgacg	gacgcgccag	catcacgaga	4140
ctgggccagt	gccgcgagcg	acctagaaac	tctcgtggcg	gatcttgagg	agctggctga	4200
cgagctgcgt	gctcggccag	cgccaggagg	acgcacagta	gtggagggatg	caatcagttg	4260
cgctactgc	ggtggcctga	ttctctcccc	gcctgaccgc	cgaggacggc	gcgcaaaata	4320
ttgctcagat	gcgtgtcgtg	ccgcagccag	ccgcgagcgc	gccaacaaac	gccacgccga	4380
ggagctggag	gcggctaggt	cgcaaattgg	gctggaagtg	cgtcccccca	gcgaaatttt	4440
ggccatggtc	gtcacagagc	tggaagcggc	agcgagaatt	atcgcgatcg	tggcggtgcc	4500
cgcaggcatg	acaaacatcg	taaatgccgc	gtttcgtgtg	ccgtggccgc	ccaggacgtg	4560
tcagcgccgc	caccacctgc	accgaatcgg	cagcagcgtc	gcgcgtcgaa	aaagcgcaca	4620
ggcggcaaga	agcgataagc	tgcacgaata	cctgaaaaat	gttgaacgcc	ccgtgagcgg	4680
taactcacag	ggcgctgggt	aacccccagt	ccaaacctgg	gagaaagcgc	tcaaaaatga	4740
ctctagcgga	ttcacgagac	attgacacac	cggcctggaa	attttccgct	gatctgttcg	4800
acacccatcc	cgagctcgcg	ctgcgatcac	gtggctggac	gagcgaagac	cgccgcgaat	4860

tcctcgctca	cctgggcaga	gaaaatttcc	agggcagcaa	gacccgcgac	ttcgccagcg	4920
cttgatcaa	agacccggac	acggagaaac	acagccgaag	ttataccgag	ttggttcaaa	4980
atcgcttgcc	cggtgccagt	atgttgctct	gacgcacgcg	cagcacgcag	ccgtgcttgt	5040
cctggacatt	gatgtgccga	gccaccaggc	cggcgggaaa	atcgagcacg	taaaccccga	5100
ggtctacgcg	attttggagc	gctgggcacg	cctggaaaaa	gcgccagctt	ggatcggcgt	5160
gaatccactg	agcgggaaat	gccagctcat	ctggctcatt	gatccggtgt	atgccgcagc	5220
aggcatgagc	agcccgaata	tgcgcctgct	ggctgcaacg	accgaggaaa	tgacccgcgt	5280
tttcggcgct	gaccaggctt	tttcacatag	gctgagccgt	ggccactgca	ctctccgacg	5340
atcccagccg	taccgctggc	atgccagca	caatcgcgtg	gatcgcctag	ctgatcttat	5400
ggaggttgct	cgcgatgatc	caggcacaga	aaaacctaaa	aaacgctatg	agcaggagtt	5460
ttctagcggg	cgggcacgta	tcgaagcggc	aagaaaagcc	actgcggaag	caaaagcact	5520
tgccacgctt	gaagcaagcc	tgccgagcgc	cgctgaagcg	tctggagagc	tgatcgacgg	5580
cgtccgtgtc	ctctggactg	ctccaggggc	tgccgcccgt	gatgagacgg	cttttcgcca	5640
cgttttgact	gtgggatacc	agttaaaagc	ggctggtgag	cgcctaaaag	acaccaaggg	5700
tcacgagcc	tacgagcgtg	cctacaccgt	cgctcaggcg	gtcggaggag	gccgtgagcc	5760
tgatctgccg	ccggactgtg	accgccagac	ggattggccg	cgacgtgtgc	gcggctacgt	5820
cgttaaaggc	cagccagtcg	tccctgctcg	tcagacagag	acgcagagcc	agccgaggcg	5880
aaaagctctg	gccactatgg	gaagacgtgg	cggtaaaaag	gccgcagAAC	gctggaaaga	5940
cccaaacagt	gagtacgcc	gagcacagcg	agaaaaacta	gctaagtcca	gtcaacgaca	6000
agctaggaaa	gctaaaggaa	atcgcttgac	cattgcaggt	tggtttatga	ctgttgaggg	6060
agagactggc	tcgtggccga	caatcaatga	agctatgtct	gaatttagcg	tgtcacgtca	6120
gaccgtgaat	agagcactta	aggtctgcgg	gcattgaact	tccacgagga	cgccgaaagc	6180
ttcccagtaa	atgtgccatc	tcgtaggcag	aaaacggttc	ccccgtaggg	tctctctctt	6240
ggcctccttt	ctaggtcggg	ctgattgctc	ttgaagctct	ctaggggggc	tcacaccata	6300
ggcagataac	gttccccacc	ggctcgcctc	gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	6360
ttcaaagcca	ctgccgcgac	tgcttctcgc	aagccttgcc	cgcgcgaaat	ttcctccacc	6420
gagttcgtgc	acacccttat	gccaagcttc	tttcacccta	aattcgagag	attggattct	6480
taccgtggaa	attcttcgca	aaaatcgctc	cctgatcgcc	cttgcgacgt	tggcgtcggg	6540
gccgctgggt	gcgcttggtt	tgaccgactt	gatcagcggc	cgc		6583

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

```

<220>
<223> Iniciador

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: BK1782

<400> 56

tcgagagatt ggattcttac                                     20

<210> 57
<211> 30
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: Haf63

<400> 57

tctcgggtacc ccgcaccgag catatacatc                         30

<210> 58
<211> 6450
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Plasmídeo

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: H479 (pC1iK5MCS PEE'-Ts metA)

<400> 58

aaatctcgag cttggtctat agtggctagg tccccccca cgacaatgga actttgactt      60
ttaaatttc atcgccgtgg gggctttttg ggcagccagc ccgccgtgtc gcaacgtaat      120
cgactgaata cctgtacgat cacttttttag acgggcgggt agggctactg tgccctaacc      180
taagcttgta aagcattaat tatccataca taaggaggat cgccccgtaa tgcccaccct      240
cgcgcccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcgggtgat gtctccaccg aagccggagc      300
aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggg gaataaccgcg tagataaaga      360
aggacgcagc aatgtcggtc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca acgcagccga      420
ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt actgcgtgat      480
ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctgggtcca tgcattcaga      540
tggaatttc tggggtaatc gttccccgc caggtccatt cgtgatcagg taaacgccga      600
aaaacaattc ctcgacgcac tcggcatcac cagggtcgcc gcagtacttg gtggttccat      660

```

gggtggtgcc	cgcaccctag	agtgggccc	aatgtaccca	gaaactgttg	gcgagctgc	720
tgttcttgca	gtttctgcac	gcgccagcgc	ctggcaaata	ggcattcaat	ccgccccaat	780
taaggcgatt	gaaaacgacc	accactggca	cgaaggcaac	tactacgaat	ccggctgcaa	840
cccagccacc	ggactcggcg	ccgcccgcgc	catcgccac	ctcacctacc	gtggcgaact	900
agaaatcgac	gaacgcttcg	gcaccaaagc	ccaaaagaac	gaaaaccac	tcggtcccta	960
ccgcaagccc	gaccagcgct	tcgccgtgga	atcctacttg	gactaccaag	cagacaagct	1020
agtacagcgt	ttcgacgcgc	gtcctacgt	cttgctcacc	gacgccctca	accgccacga	1080
cattggtcgc	gaccgcggag	gcctcaacaa	ggcactcgaa	tccatcaaag	ttccagtcct	1140
tgtcgcaggc	gtagataccg	atattttgta	cccctaccac	cagcaagaac	acctctccag	1200
aaacctggga	aatctactgg	caatggcaaa	aatcgatatc	cctgtcggcc	acgatgcttt	1260
cctcaccgaa	agccgccaaa	tggatcgcat	cgtgaggaac	ttcttcagcc	tcctctcccc	1320
agacgaagac	aacccttcga	cctacatcga	gttctacatc	taagtcgaca	tcgatgctct	1380
tctgcgttaa	ttaacaattg	ggatcctcta	gagttctgtg	aaaaacaccg	tggggcagtt	1440
tctgcttcgc	ggtgtttttt	atgtgtgggg	cactagaccc	gggatttaaa	tcgctagcgg	1500
gctgctaaag	gaagcgggaa	acgtagaaa	ccagtcgcga	gaaacgggtg	tgaccccgga	1560
tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	aagcgcaaag	agaaagcagg	1620
tagcttgtag	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	ggttttatgg	acagcaagcg	1680
aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaagggttg	gaagccctgc	aaagtaaaact	1740
ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgagggg	atcaagatct	gatcaagaga	1800
caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	gcacgcaggt	tctccggccg	1860
cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	gacaatcggc	tgctctgatg	1920
ccgccgtggt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	ttttgtcaag	accgacctgt	1980
ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggt	atcgtagctg	gccacgacgg	2040
gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	gggaagggac	tggctgctat	2100
tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	tgctcctgcc	gagaaagtat	2160
ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggctgc	atacgcttga	tccggctacc	tgcccattcg	2220
accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	gatggaagcc	ggtcttgctg	2280
atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	agccgaactg	ttcgccaggc	2340
tcaaggcgcg	catgcccgc	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	ccatggcgat	gcctgcttgc	2400
cgaatatcat	ggtggaaaa	ggccgctttt	ctggattcat	cgactgtggc	cggctgggtg	2460
tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctgga	tattgctgaa	gagcttggcg	2520

gogaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	cgctcccgat	tcgcagcgca	2580
tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	actctggggt	tcgaaatgac	2640
cgaccaagcg	acgccaacc	tgccatcacg	agatttcgat	tcacccgccc	ccttctatga	2700
aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	cgccggctgg	atgatcctcc	agcgcgggga	2760
tctcatgctg	gagttcttcg	cccacgctag	cggcgcgcgc	gccggcccgc	tgtgaaatac	2820
cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	2880
actcgctgcg	ctcggtcggt	cggtgcggc	gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	2940
tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	3000
aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	3060
ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	3120
aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcgctgcg	ctctcctggt	ccgaccctgc	3180
cgcttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	3240
cacgctgtag	gtatctcagt	tcgggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	3300
aacccccctg	tcagcccagc	cgctgcgcct	tatccggtaa	ctatcgctt	gagtccaacc	3360
cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	3420
ggatatgtagg	cgggtctaca	gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	3480
ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	3540
gctcttgatc	cggcaaacia	accaccgctg	gtagcggtagg	tttttttggt	tgcaagcagc	3600
agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acgggggtctg	3660
acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	3720
tcttcacctg	gaccttttta	aaggccggcc	gcggccgcgc	aaagtcccgc	ttcgtgaaaa	3780
ttttcgtgcc	gcgtgatttt	ccgccaaaaa	ctttaacgaa	cgttcggttat	aatgggtgtca	3840
tgaccttcac	gacgaagtac	taaaattggc	ccgaatcatc	agctatggat	ctctctgatg	3900
tcgcgctgga	gtccgacgcg	ctcgatgctg	ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcggtattt	3960
tccgagctct	cgatacgacg	gacgcgccag	catcacgaga	ctggggccagt	gccgcgagcg	4020
acctagaaac	tctcgtggcg	gatcttgagg	agctggctga	cgagctgcgt	gctcggccag	4080
cgccaggagg	acgcacagta	gtggaggatg	caatcagttg	cgcctactgc	ggtggcctga	4140
ttcctccccg	gcctgaccgc	cgaggacggc	gcgcaaaata	ttgctcagat	gcgtgtcgtg	4200
ccgcagccag	ccgcgagcgc	gccaaacaac	gccacgccga	ggagctggag	gcggctaggt	4260
cgcaaatggc	gctggaagtg	cgtcccccca	gcgaaatttt	ggccatggtc	gtcacagagc	4320
tggaagcggc	agcgagaatt	atcgcgatcg	tggcggtgcc	cgcaggcatg	acaaacatcg	4380

taaatgccgc	gtttcgtgtg	ccgtggccgc	ccaggacgtg	tcagcgccgc	caccacctgc	4440
accgaatcgg	cagcagcgtc	gcgcgtcgaa	aaagcgcaca	ggcggcaaga	agcgataagc	4500
tgcacgaata	cctgaaaaat	gttgaacgcc	ccgtgagcgg	taactcacag	ggcgtcggct	4560
aacccccagt	ccaaacctgg	gagaaaagcg	tcaaaaatga	ctctagcggg	ttcacgagac	4620
attgacacac	cggcctggaa	attttccgct	gatctgttcg	acacccatcc	cgagctcgcg	4680
ctgcgatcac	gtggctggac	gagcgaagac	cgccgcgaat	tcctcgctca	cctgggcaga	4740
gaaaatttcc	agggcagcaa	gacccgcgac	ttcgccagcg	cttgatcaa	agacccggac	4800
acggagaaac	acagccgaag	ttataccgag	ttggttcaaa	atcgcttgcc	cggtgccagt	4860
atgttgctct	gacgcacgcg	cagcacgcag	ccgtgcttgt	cctggacatt	gatgtgccga	4920
gccaccaggc	cggcgggaaa	atcgagcacg	taaacccga	ggtctacgcg	attttgagc	4980
gctgggcacg	cctggaaaaa	gcgccagctt	ggatcggcgt	gaatccactg	agcgggaaat	5040
gccagctcat	ctggctcatt	gatccggtgt	atgccgcagc	aggcatgagc	agcccgaata	5100
tgcgcctgct	ggctgcaacg	accgaggaaa	tgacccgcgt	tttcggcgct	gaccaggctt	5160
tttcacatag	gctgagccgt	ggccactgca	ctctccgacg	atcccagccg	taccgctggc	5220
atgcccgaca	caatcgctg	gatcgcttag	ctgatcttat	ggaggttgct	cgcatgatct	5280
caggcacaga	aaaacctaaa	aaacgctatg	agcaggagtt	ttctagcggg	cgggcacgta	5340
tcgaagcggc	aagaaaagcc	actgcggaag	caaaagcact	tgccacgctt	gaagcaagcc	5400
tgccgagcgc	cgctgaagcg	tctggagagc	tgatcgacgg	cgcccggtgc	ctctggactg	5460
ctccagggcg	tgccgcccgt	gatgagacgg	cttttcgcca	cgctttgact	gtgggatacc	5520
agttaaaagc	ggctggtgag	cgccataaaag	acaccaaggg	tcacgagacc	tacgagcgtg	5580
cctacaccgt	cgctcaggcg	gtcggaggag	gccgtgagcc	tgatctgccg	ccggactgtg	5640
accgccagac	ggattggccg	cgacgtgtgc	gcggctacgt	cgctaaaggc	cagccagtcg	5700
tccctgctcg	tcagacagag	acgcagagcc	agccgaggcg	aaaagctctg	gccactatgg	5760
gaagacgtgg	cggtaaaaag	gccgcagaac	gctggaaaga	cccaaacagt	gagtacgccc	5820
gagcacagcg	agaaaaacta	gctaagtcca	gtcaacgaca	agctaggaaa	gctaaaggaa	5880
atcgcttgac	cattgcaggt	tggtttatga	ctgttgaggg	agagactggc	tcgtggccga	5940
caatcaatga	agctatgtct	gaatttagcg	tgtcacgtca	gaccgtgaat	agagcactta	6000
aggtctgcgg	gcattgaact	tccacgagga	cgccgaaagc	ttcccagtaa	atgtgccatc	6060
tcgtaggcag	aaaacggttc	ccccgtaggg	tctctctctt	ggcctccttt	ctaggtcggg	6120
ctgattgctc	ttgaagctct	ctaggggggc	tcacaccata	ggcagataac	gttccccacc	6180
ggctcgccctc	gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgccgcgac	6240

tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat ttcctccacc gagttcgtgc acacccttat 6300
 gccaaagcttc tttcacccta aattcgagag attggattct taccgtggaa attcttcgca 6360
 aaaatcgtcc cctgatcgcc cttgcgacgt tggcgtcggt gccgctgggt gcgcttggct 6420
 tgaccgactt gatcagcggc cgctcgattt 6450

<210> 59

<211> 6759

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: HS01 (pC11R5MCS Pgro Psod Pefts metA)

<400> 59

aaatctcgag cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga 60
 gtgctggcac tctcgggggt agagtgccaa atagggtgtt tgacacacag ttgttcaccc 120
 ggcacgacgg ctgtgctgga aaccacaaac cggcacacac aaaatactag tagctgccaa 180
 ttattccggg cttgtgaccc gctacccgat aaataggtcg gctgaaaaat ttcgttgcaa 240
 tatcaacaaa aaggcctatc attgggaggt gtcgcaccaa gtacttttgc gaagcgccat 300
 ctgacggatt ttcaaaagat gtatatgctc ggtgcgggggt accccccccac gacaatggaa 360

 ctttgacttt taaaatttca tcgccgtggg ggcttttttg gcagccagcc cgccgtgtcg 420
 caacgtaatc gactgaatac ctgtacgatc acttttttaga cgggcgggta gggctactgt 480
 gccctaacct aagcttgtaa agcattaatt atccatacat aaggaggatc gccccgtaat 540
 gccacccctc gcgccttcag gtcaacttga aatccaagcg atcgggtgatg tctccaccga 600
 agccggagca atcattacaa acgctgaaat cgcctatcac cgctgggggtg aataccgcgt 660
 agataaagaa ggacgcagca atgtcgttct catcgaacac gccctcactg gagattccaa 720
 cgcagccgat tgggtgggctg acttgctcgg tcccggcaaa gccatcaaca ctgatattta 780
 ctgcgtgatc tgtaccaacg tcatcggtgg ttgcaacggt tccaccggac ctggctccat 840
 gcatccagat ggaaatttct ggggtaatcg cttccccgcc acgtccattc gtgatcaggt 900
 aaacgccgaa aaacaattcc tcgacgcact cggcatcacc acggtcgccg cagtacttgg 960
 tggttccatg ggtggtgcc gcaccctaga gtgggcccga atgtaccag aaactgttgg 1020
 cgcagctgct gttcttgacg tttctgcacg cgccagcgcc tggcaaatac gcattcaatc 1080
 cgcccaaatt aaggcgattg aaaacgacca cactggcac gaaggcaact actacgaatc 1140
 cggctgcaac ccagccaccg gactcggcgc cgcccgacgc atcgcccacc tcacctaccg 1200

tggcgaacta	gaaatcgacg	aacgcttcg	caccaaagcc	caaaagaacg	aaaaccact	1260
cggtccctac	cgcaagcccg	accagcgctt	cgccgtggaa	tcctacttgg	actaccaagc	1320
agacaagcta	gtacagcggt	tcgacgccgg	ctcctacgtc	ttgctcaccg	acgccctcaa	1380
ccgccacgac	attggtcgcg	acgcgggagg	cctcaacaag	gcactcgaat	ccatcaaagt	1440
tccagtcctt	gtcgcaggcg	tagataccga	tattttgtac	ccctaccacc	agcaagaaca	1500
cctctccaga	aacctgggaa	atctactggc	aatggcaaaa	atcgatatccc	ctgtcggcca	1560
cgatgctttc	ctcaccgaaa	gccgccaaat	ggatcgcctc	gtgaggaact	tcttcagcct	1620
catctcccca	gacgaagaca	acccttcgac	ctacatcgag	ttctacatct	aagtcgacat	1680
cgatgctctt	ctgcgttaat	taacaattgg	gatcctctag	agttctgtga	aaaacaccgt	1740
ggggcagttt	ctgcttcgcg	gtgtttttta	tttgtggggc	actagaccgg	ggatttaaat	1800
cgctagcggg	ctgctaaagg	aagcgggaaca	cgtagaaagc	cagtcgcgag	aaacggtgct	1860
gaccccgcat	gaatgtcagc	tactgggcta	tctggacaag	ggaaaacgca	agcgcaaaga	1920
gaaagcaggt	agcttgagct	gggcttacat	ggcgatagct	agactgggcg	gttttatgga	1980
cagcaagcga	accggaattg	ccagctgggg	cgccctctgg	taaggttggg	aagccctgca	2040
aagtaaactg	gatggctttc	ttgcccga	ggatctgatg	gcgaggggga	tcaagatctg	2100
atcaagagac	aggatgagga	tcgttttcgca	tgattgaaca	agatggattg	cacgcagggt	2160
ctccggccgc	ttgggtggag	aggctattcg	gctatgactg	ggcacaacag	acaatcggct	2220
gctctgatgc	cgccgtgttc	cggctgtcag	cgcagggggc	cccggttctt	tttgtcaaga	2280
ccgacctgtc	cggtgccctg	aatgaactgc	aggacgaggc	agcgcggtta	tcgtggctgg	2340
ccacgacggg	cgcttccttg	gcagctgtgc	tcgacgttgt	cactgaagcg	ggaagggact	2400
ggctgctatt	gggcgaagtg	ccggggcagg	atctcctgtc	atctcacctt	gtccctgccg	2460
agaaagtatc	catcatggct	gatgcaatgc	ggcggtgca	tacgcttgat	ccggctacct	2520
gccatttcga	ccaccaagcg	aaacatcgca	tcgagcgagc	acgtactcgg	atggaagccg	2580
gtcttgtcga	tcaggatgat	ctggacgaag	agcatcaggg	gctcgcgcca	gccgaactgt	2640
tcgccaggct	caaggcgcg	atgcccagcg	gcgaggatct	cgtcgtgacc	catggcgatg	2700
cctgcttgcc	gaatatcatg	gtggaaaatg	gccgcttttc	tggattcatc	gactgtggcc	2760
ggctgggtgt	ggcggaccgc	tatcaggaca	tagcgttggc	taccgtgat	attgctgaag	2820
agcttgggcg	cgaatgggct	gaccgcttcc	tcgtgcttta	cggtatcgcc	gtccccgatt	2880
cgcagcgcac	cgccttctat	cgccttcttg	acgagttctt	ctgagcggga	ctctgggggt	2940
cgaaatgacc	gaccaagcga	cgcccaacct	gccatcacga	gatttcgatt	ccaccgcccgc	3000
cttctatgaa	aggttgggct	tcggaatcgt	tttccgggac	gccggctgga	tgatcctcca	3060
gcgcggggat	ctcatgctgg	agttcttcgc	ccacgctagc	ggcgcgcggg	ccggcccgggt	3120

gtgaaatacc	gcacagatgc	gtaaggagaa	aataccgcat	caggcgctct	tccgcttccct	3180
cgctcactga	ctcgctgcgc	tcggtcgttc	ggctgcggcg	agcggtatca	gctcactcaa	3240
aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	3300
aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	3360
tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagagggtg	cgaaacccga	3420
caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	3480
cgaccctgcc	gcttacccga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcggaagc	gtggcgcttt	3540
ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	3600
gtgtgcacga	acccccggt	cagcccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	3660
agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactgg	aacaggatta	3720
gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	3780
acaactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	3840
gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcggtggt	ttttttgttt	3900
gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	3960
cggggctctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttgggc	atgagattat	4020
caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	aggccggccg	cgccgcgcga	aagtcccgct	4080
tcgtgaaaat	tttcgtgccg	cgtgattttc	cgccaaaaac	tttaacgaac	gttcgttata	4140
atggtgtcat	gaccttcacg	acgaagtact	aaaattggcc	cgaatcatca	gctatggatc	4200
tctctgatgt	cgcgctggag	tccgacgcgc	tcgatgctgc	cgtcgattta	aaaacggtga	4260
tcggattttt	ccgagctctc	gatacgacgg	acgcgccagc	atcacgagac	tgggccagtg	4320
ccgcgagcga	cctagaaact	ctcgtggcgg	atcttgagga	gctggctgac	gagctgcgtg	4380
ctcggccagc	gccaggagga	cgcacagtag	tggaggatgc	aatcagttgc	gcctactgcg	4440
gtggcctgat	tctcccccg	cctgacccgc	gaggacggcg	cgcaaaatat	tgctcagatg	4500
cgtgtcgtgc	cgagccagc	cgcgagcgcg	ccaacaaacg	ccacgcccag	gagctggagg	4560
cggctaggtc	gcaaattggc	ctggaagtgc	gtcccccgag	cgaaattttg	gcatggtcgc	4620
tcacagagct	ggaagcggca	gcgagaatta	tcgcgatcgt	ggcgggtgcc	gcaggcatga	4680
caaacatcgt	aatgcccgcg	tttcgtgtgc	cgtggccgcc	caggacgtgt	cagcgccgcc	4740
accacctgca	ccgaatccgc	agcagcgctc	cgctcgaaa	aagcgcacag	gcggcaagaa	4800
gcgataagct	gcacgaatac	ctgaaaaatg	ttgaacgccc	cgtgagcggt	aactcacagg	4860
gcgtcggcta	acccccagtc	caaacctggg	agaaagcgct	caaaaatgac	tctagcggat	4920
tcacgagaca	ttgacacacc	ggcctggaaa	ttttccgctg	atctgttcga	cacccatccc	4980

gagctcgcgc	tgcgatcacg	tggctggacg	agcgaagacc	gccgcgaatt	cctcgctcac	5040
ctgggcagag	aaaatttcca	gggcagcaag	acccgcgact	tcgccagcgc	ttggatcaaa	5100
gacccggaca	cggagaaaca	cagccgaagt	tataccgagt	tggttcaaaa	tcgcttgccc	5160
ggtgccagta	tgttgctctg	acgcacgcgc	agcacgcagc	cgtgcttgct	ctggacattg	5220
atgtgccgag	ccaccaggcc	ggcgggaaaa	tcgagcacgt	aaaccccgag	gtctacgcga	5280
ttttggagcg	ctgggcacgc	ctggaaaaag	cgccagcttg	gatcggcgtg	aatccactga	5340
gcgggaaatg	ccagctcatc	tggctcattg	atccggtgta	tgccgcagca	ggcatgagca	5400
gcccgaatat	gcgcctgctg	gctgcaacga	ccgaggaaat	gacccgcgtt	ttcggcgctg	5460
accaggcttt	ttcacatagg	ctgagccgtg	gccactgcac	tctccgacga	tcccagccgt	5520
accgctggca	tgcccagcac	aatcgcgctg	atcgccctagc	tgatcttatg	gagggttgctc	5580
gcatgatctc	aggcacagaa	aaacctaata	aacgctatga	gcaggagttt	tctagcggac	5640
gggcacgtat	cgaagcggca	agaaaagcca	ctgcggaagc	aaaagcactt	gccacgcttg	5700
aagcaagcct	gccgagcgcc	gctgaagcgt	ctggagagct	gatcgacggc	gtccgtgtcc	5760
tctggactgc	tccagggcgt	gccgcccgtg	atgagacggc	ttttcgccac	gctttgactg	5820
tgggatacca	gttaaaagcg	gctggtgagc	gcctaaaaga	caccaagggt	catcgagcct	5880
acgagcgtgc	ctacacgcgc	gctcaggcgg	tcggaggagg	ccgtgagcct	gatctgccgc	5940
cggactgtga	ccgccagacg	gattggccgc	gacgtgtgcg	cggctacgtc	gctaaaggcc	6000
agccagtcgt	ccctgctcgt	cagacagaga	cgcagagcca	gccgaggcga	aaagctctgg	6060
ccactatggg	aagacgtggc	ggtaaaaagg	ccgcagaacg	ctggaaagac	ccaaacagtg	6120
agtacgcccg	agcacagcga	gaaaaactag	ctaagtcag	tcaacgacaa	gctaggaaaag	6180
ctaaaggaaa	tcgcttgacc	attgcagggt	ggtttatgac	tgttgaggga	gagactggct	6240
cgtggccgac	aatcaatgaa	gctatgtctg	aatttagcgt	gtcacgtcag	accgtgaata	6300
gagcacttaa	ggtctgcggg	cattgaactt	ccacgaggac	gccgaaagct	tcccagtaaa	6360
tgtgccatct	cgtaggcaga	aaacggttcc	cccgtagggt	ctctctcttg	gcctcctttc	6420
taggtcgggc	tgattgctct	tgaagctctc	taggggggct	cacaccatag	gcagataacg	6480
ttccccaccg	gctcgccctg	taagcgcaca	aggactgctc	ccaaagatct	tcaaagccac	6540
tgccgcgact	gccttcgcga	agccttgccc	cgcggaaatt	tcctccaccg	agttcgtgca	6600
cacccctatg	ccaagcttct	ttcacccata	attcgagaga	ttggattctt	accgtggaaa	6660
ttcttcgcaa	aaatcgctcc	ctgatcgccc	ttgcgacgtt	ggcgtcgggtg	ccgctgggtg	6720
cgcttggtct	gaccgacttg	atcagcggcc	gctcgattt			6759

<211> 6780
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Plasmídeo
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna : H502 (pClik5MCS Peftu Psod Pefts metA)

<400> 60
 aaatctcgag ggccgttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa 60
 cgccgttgcc cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct 120
 cagtcttcca ggctgcttat cacagtga aa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt 180
 agccacacta gtagctgcca attattccgg gcttgtgacc cgctaccga taaataggtc 240
 ggctgaaaaa tttcgttgca atatcaacaa aaaggcctat cattgggagg tgtcgcacca 300
 agtacttttg cgaagcgcca tctgacggat tttcaaaaga tgtatatgct cggtgcgggg 360
 tccccccca cgacaatgga actttgactt taaaatttc atcgccgtgg gggctttttg 420
 ggcagccagc ccgccgtgtc gcaacgtaat cgactgaata cctgtacgat cacttttttag 480
 acggggcggg agggtactg tgccctaacc taagcttgta aagcattaat tatccataca 540
 taaggaggat cgccccgtaa tgcccaccct cgcgcttca ggtcaacttg aaatccaagc 600
 gatcggtgat gtctccaccg aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca 660
 ccgctggggg gaataccgcg tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca 720
 cgccctcact ggagattcca acgcagccga ttgggtgggt gacttgctcg gtcccggcaa 780
 agccatcaac actgatattt actgcgtgat ctgtaccaac gtcacgggtg gttgcaacgg 840
 ttccaccgga cctggctcca tgcattcaga tggaaatttc tggggtaatc gcttccccgc 900
 cacgtocatt cgtgatcagg taaacgccga aaaacaattc ctgcagcac tcggcatcac 960
 cacggctgcc gcagtacttg gtggttccat ggggtggtgcc cgcaccctag agtgggcccgc 1020
 aatgtacca gaaactgttg gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc 1080
 ctggcaaadc ggcatcatt ccgccccaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca 1140
 cgaaggcaac tactacgaat ccggctgcaa ccagccacc ggactcggcg ccgcccgacg 1200
 catcgcacc ctcacctacc gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc 1260
 ccaaaagaac gaaaaccac tcgggtcccta ccgcaagccc gaccagcgt tcgccgtgga 1320
 atcctacttg gactaccaag cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gtcctacgt 1380
 cttgctcacc gacgccctca accgccacga cattggctgc gaccgaggag gcctcaacaa 1440
 ggcaactcgaa tccatcaaag ttccagtcct tgtcgcaggc gtagataccg atattttgta 1500
 cccctaccac cagcaagaac acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa 1560

aatcgtatcc	cctgtcggcc	acgatgcttt	cctcaccgaa	agccgccaaa	tggatcgc	1620
cgtgaggaac	ttcttcagcc	tcattctccc	agacgaagac	aacccttcga	cctacatcga	1680
gttctacatc	taagtgcaca	tcgatgctct	tctgcgttaa	ttaacaattg	ggatcctcta	1740
gagttctgtg	aaaaacaccg	tggggcagtt	tctgcttcgc	ggtgtttttt	atttgtgggg	1800
cactagaccc	gggatttaaa	tcgctagcgg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaag	1860
ccagtccgca	gaaacgggtgc	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	1920
gggaaaacgc	aagcgcaaag	agaaagcagg	tagcttgacg	tgggcttaca	tggcgatagc	1980
tagactgggc	ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	2040
gtaagggttg	gaagccctgc	aaagtaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	2100
ggcgcagggg	atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	2160
aagatggatt	gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	2220
gggcacaaca	gacaatcggc	tgctctgatg	ccgccgtggt	ccggctgtca	gcgcaggggc	2280
gcccggttct	ttttgtcaag	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	2340
cagcgcggct	atcgtggctg	gccacgacgg	gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	2400
tcactgaagc	gggaagggaac	tggtgcttat	tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	2460
catctcacct	tgctcctgcc	gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggctgc	2520
atacgcttga	tccggctacc	tgcccattcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	2580
cacgtactcg	gatggaagcc	ggtcttgctg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	2640
ggctcgcgcc	agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgcg	ggcgaggatc	2700
tcgtcgtgac	ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	2760
ctggattcat	cgactgtggc	cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	2820
ctacccgtga	tattgctgaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	2880
acggtatcgc	cgctcccgat	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	2940
tctgagcggg	actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccgaac	tgccatcacg	3000
agatttctgat	tccaccgcgc	ccttctatga	aagggtgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	3060
cgcgcggctg	atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccacgctag	3120
cggcgcgcgc	gccggccccg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	3180
tcaggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcggt	cggctgcggc	3240
gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	3300
caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	3360
tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	3420

gtcagaggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	3480
ccctcgtgcg	ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttacccg	atacctgtcc	gcctttctcc	3540
cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	3600
tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccgt	tcagcccgc	cgctgcgcct	3660
tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	3720
cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cggtgctaca	gagttcttga	3780
agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	3840
agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaaaaa	accaccgctg	3900
gtagcgggtg	tttttttggt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	3960
aagatccttt	gatcttttct	acgggggtctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	4020
ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	gatcctttta	aaggccggcc	4080
gcggccgcgc	aaagtccgc	ttcgtgaaaa	tttctgtgcc	gcgtgatttt	ccgccaaaaa	4140
ctttaacgaa	cgttcgttat	aatggtgtca	tgaccttcac	gacgaagtac	taaaattggc	4200
ccgaatcatc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgctgga	gtccgacgcg	ctcgatgctg	4260
ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcggatttt	tccgagctct	cgatacgacg	gacgcgccag	4320
catcacgaga	ctgggccagt	gcgcgagcgc	acctagaaac	tctcgtggcg	gatcttgagg	4380
agctggctga	cgagctgcgt	gctcggccag	cgccaggagg	acgcacagta	gtggagggatg	4440
caatcagttg	cgctactgc	ggtggcctga	ttctccccg	gcctgaccgc	cgaggacggc	4500
gcgcaaaaata	ttgctcagat	gcgtgtcgtg	ccgcagccag	ccgcgagcgc	gccaaacaaac	4560
gccacgccga	ggagctggag	gcggctaggt	cgcaaattgg	gctggaagtg	cgtccccga	4620
gcgaaatttt	ggccatggtc	gtcacagagc	tggaagcggc	agcgagaatt	atcgcgatcg	4680
tggcggtgcc	cgcaggcatg	acaaacatcg	taaatgccgc	gtttcgtgtg	ccgtggccgc	4740
ccaggacgtg	tcagcgccgc	caccacctgc	accgaatcgg	cagcagcgtc	gcgcgtcgaa	4800
aaagcgcaca	ggcggcaaga	agcgataagc	tgacgaata	cctgaaaaat	gttgaacgcc	4860
ccgtgagcgg	taactcacag	ggcgctgggt	aacccccagt	ccaaacctgg	gagaaagcgc	4920
tcaaaaatga	ctctagcggg	ttcacgagac	attgacacac	cggcctggaa	attttccgct	4980
gatctgttcg	acacccatcc	cgagctcgcg	ctgcgatcac	gtggctggac	gagcgaagac	5040
cgccgcgaat	tcctcgtcga	cctgggcaga	gaaaatttcc	agggcagcaa	gacccgcgac	5100
ttcgccagcg	cttgatcaa	agacccggac	acggagaaaac	acagccgaag	ttataccgag	5160
ttggttcaaa	atcgcttgcc	cggtgccagt	atgttgctct	gacgcacgcg	cagcacgcag	5220
ccgtgcttgt	cctggacatt	gatgtgccga	gccaccaggc	cggcgggaaa	atcgagcacg	5280
taaaccccca	ggtctacgcg	attttgagc	gctgggcacg	cctggaaaaa	gcgccagctt	5340

ggatcggcgt gaatccactg agcgggaaat gccagctcat ctggctcatt gatccggtgt 5400
 atgccgcagc aggcattgagc agcccgaata tgcgcctgct ggctgcaacg accgaggaaa 5460
 tgacccgcgt ttctggcgct gaccaggctt ttccacatag gctgagccgt ggccactgca 5520
 ctctccgacg atcccagccg taccgctggc atgccagca caatcgctg gatcgcttag 5580
 ctgatcttat ggaggttgct cgcattgatct caggcacaga aaaacctaaa aaacgctatg 5640
 agcaggagtt ttctagcggg cgggcacgta tcgaagcggc aagaaaagcc actgcggaag 5700
 caaaagcact tgccacgctt gaagcaagcc tgccgagcgc cgctgaagcg tctggagagc 5760
 tgatcgacgg cgtccgtgtc ctctggactg ctccaggggc tgccgcccgt gatgagacgg 5820
 cttttcgcca cgctttgact gtgggatacc agttaaagc ggctgggtgag cgcctaaaag 5880
 acaccaaggg tcatcgagcc tacgagcgtg cctacaccgt cgctcaggcg gtcggaggag 5940
 gccgtgagcc tgatctgccg ccggactgtg accgccagac ggattggccg cgacgtgtgc 6000
 gcggctacgt cgctaaaggc cagccagtcg tccctgctcg tcagacagag acgcagagcc 6060
 agccgaggcg aaaagctctg gccactatgg gaagacgtgg cggtaaaaag gccgcagaac 6120
 gctggaaaga cccaaacagt gactacgccg gagcacagcg agaaaaacta gctaagtcca 6180
 gtcaacgaca agctaggaaa gctaaaggaa atcgcttgac cattgcaggt tggtttatga 6240
 ctggtgaggg agagactggc tcgtggccga caatcaatga agctatgtct gaatttagcg 6300
 tgtcacgtca gaccgtgaat agagcactta aggtctgcgg gcattgaact tccacgagga 6360
 cgccgaaagc ttcccagtaa atgtgccatc tcgtaggcag aaaacggttc ccccgtaggg 6420
 tctctctctt ggctcctttt ctaggtcggg ctgattgctc ttgaagctct ctaggggggc 6480
 tcacaccata ggcagataac gttccccacc ggctcgctc gtaagcgcac aaggactgct 6540
 cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tgccttcgcg aagccttgcc ccgcggaaat 6600
 ttcctccacc gagttcgtgc acaccctat gccaaagctt tttacccta aattcgagag 6660
 attggattct taccgtggaa attcttcgca aaaatcgcc cctgatcgcc cttgcgacgt 6720
 tggcgctcgt gccgctggtt gcgcttggtt tgaccgactt gatcagcggc cgctcgattt 6780

<210> 61

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 61

gagagagaga cgctcccag tggctgagac gcac

35

<210> 62

<211> 34

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 62

ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg

34

<210> 63
 <211> 4323
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Plasmideo

<220>
 <221> misc_feature
 <223> designação interna: pCLiK5 MCS integrativo SacB (também aludido como pCIS)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (457)..(1248)
 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3840)..(4302)
 <223> PsacB (complementar)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2418)..(3839)
 <223> SacB (complementar)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15/5)..(2375)
 <223> Ori-Ec (pMn) (complementar)

<400> 63

tcgagaggcc tgacgtcggg ccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctaggga	60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga	120
tttaaatacgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa	180
cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc	240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt	300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag	360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca	420
agatctgata aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac	480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca	540

atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	600
gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	660
tggctggcca	cgacgggctg	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	720
agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	780
cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	840
gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcgagcacg	tactcggatg	900
gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	960
gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	cccgacggcg	aggatctcgt	cgtgacccat	1020
ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	gaaaatggcc	gcttttcttg	attcatcgac	1080
tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	1140
gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgcttctctg	tgctttaacg	tatcgccgct	1200
cccgatctgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	1260
tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	1320
ccgcgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	1380
tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcca	cgctagcggc	gcgccggccg	1440
gcccggtgtg	aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	1500
gcttctctgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	1560
cactcaaagg	cggtaatagc	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	1620
tgagcaaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	1680
cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	1740
aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	1800
cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	1860
gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	1920
ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttata	cggtaactat	1980
cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	2040
aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggg	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	2100
tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	2160
ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtaggttt	2220
tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	2280
ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	2340
agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaagg	ccggccgcgg	ccgccatcgg	2400

cattttcttt	tgcgttttta	tttgtttaact	gttaattgtc	ettgttcaag	gatgctgtct	2460
ttgacaacag	atgttttctt	gcctttgatg	ttcagcagga	agctcgggcg	aaacgttgat	2520
tgtttgtctg	cgtagaatcc	tctgtttgtc	atatagcttg	taatcacgac	attgtttcct	2580
ttcgcttgag	gtacagcgaa	gtgtgagtaa	gtaaaggtta	catcgttagg	atcaagatcc	2640
atttttaaca	caaggccagt	tttgttcagc	ggcttgatg	ggccagttaa	agaattagaa	2700
acataaccaa	gcatgtaaat	atcgtttagac	gtaatgccgt	caatcgtcac	ttttgatccg	2760
cgggagtcag	tgaacaggta	ccatttgccg	ttcattttaa	agacgttcgc	gcgttcaatt	2820
tcatctgtta	ctgtgttaga	tgcaatcagc	ggtttcatca	cttttttcag	tgtgtaatca	2880
tcgttttagct	caatcatacc	gagagcgccg	tttgctaact	cagccgtgcg	ttttttatcg	2940
ctttgcagaa	gtttttgact	ttcttgacgg	aagaatgatg	tgcttttgcc	atagtatgct	3000
ttgttaaata	aagattcttc	gccttggtag	ccatcttcag	ttccagtgtt	tgcttcaaatt	3060
actaagtatt	tgtggccttt	atcttctacg	tagtgaggat	ctctcagcgt	atggttgtcg	3120
cctgagctgt	agttgccttc	atcgatgaac	tgctgtacat	tttgatacgt	ttttccgtca	3180
ccgtcaaaga	ttgatttata	atcctctaca	ccgttgatgt	tcaaagagct	gtctgatgct	3240
gatacgttaa	cttgtgcagt	tgtcagtggt	tgtttgccgt	aatgtttacc	ggagaaatca	3300
gtgtagaata	aacggatttt	tccgtcagat	gtaaatgtgg	ctgaacctga	ccattcttgt	3360
gtttggtctt	ttaggataga	atcatttgca	tcgaatttgt	cgtctgtctt	aaagacgcgg	3420
ccagcgtttt	tccagctgtc	aatagaagtt	tcgccgactt	tttgatagaa	catgtaaatc	3480
gatgtgtcat	ccgcattttt	aggatctccg	gctaatagca	agacgatgtg	gtagccgtga	3540
tagtttgcca	cagtgccgtc	agcgttttgt	aatggccagc	tgtcccaaac	gtccaggcct	3600
tttgcagaag	agatattttt	aattgtggac	gaatcaaatt	cagaaacttg	atatttttca	3660
tttttttgct	gttcagggat	ttgcagcata	tcatggcgtg	taatatggga	aatgccgtat	3720
gtttccttat	atggcttttg	gttcgtttct	ttcgcaaacg	cttgagttgc	gcctcctgcc	3780
agcagtgccg	tagtaaaggt	taatactgtt	gcttgttttg	caaacttttt	gatgttcac	3840
gttcatgtct	ccttttttat	gtactgtgtt	agcggctctg	ttcttccagc	cctcctgttt	3900
gaagatggca	agttagttac	gcacaataaa	aaaagaccta	aaatatgtaa	ggggtgacgc	3960
caaagtatac	actttgccct	ttacacattt	taggtcttgc	ctgctttatc	agtaacaaac	4020
ccgcgcgatt	tacttttcga	cctcattcta	ttagactctc	gtttggattg	caactggtct	4080
attttcctct	tttgtttgat	agaaaatcat	aaaaggattt	gcagactacg	ggcctaaaga	4140
actaaaaaat	ctatctgttt	cttttcattc	tctgtatttt	ttatagtttc	tgttgcatgg	4200
gcataaagtt	gcctttttta	tcacaattca	gaaaatatca	taatatctca	tttactaaa	4260
taatagttaa	cggcaggtat	atgtgatggg	ttaaaaagga	tcggcgcccg	ctcgatttaa	4320

atc

4323

<210> 64
 <211> 5860
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Plasmídeo

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (155)..(1420)
 <223> lysC

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3935)..(5356)
 <223> sacs (Bacillus subtilis)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5357)..(5819)
 <223> Promotor sacB complemento

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1974)..(2765)
 <223> kanR

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3032)..(3892)
 <223> Ori-EC complement

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3913)..(3934)
 <223> região sacs a jusante (complemento)

 <400> 64

cccggtagca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc	60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt	120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg	180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac	240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga	300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct	360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtccttgg	420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg	480
aaacgcacgc attgttgatg tcaactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa	540
gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacggt	600

gggtcgtggt	ggttctgaca	ccactgcagt	tgcgttggca	gctgctttga	acgctgatgt	660
gtgtgagatt	tactcggacg	ttgacggtgt	gtataccgct	gacccgcgca	tcgttcctaa	720
tgcacagaag	ctggaaaagc	tcagcttcga	agaaatgctg	gaacttgctg	ctgttggctc	780
caagattttg	gtgctgcgca	gtgttgaata	cgctcgtgca	ttcaatgtgc	cacttcgcgt	840
acgctcgtct	tatagtaatg	atcccggcac	tttgattgcc	ggctctatgg	aggatattcc	900
tgtggaagaa	gcagtcctta	ccggtgtcgc	aaccgacaag	tccgaagcca	aagtaaccgt	960
tctgggtatt	tccgataagc	caggcgaggc	tgcgaagggt	ttccgtgcgt	tggctgatgc	1020
agaaatcaac	attgacatgg	ttctgcagaa	cgtctcttct	gtagaagacg	gcaccaccga	1080
catcaccttc	acctgccttc	gttccgacgg	ccgccgcgcg	atggagatct	tgaagaagct	1140
tcaggttcag	ggcaactgga	ccaatgtgct	ttacgacgac	caggtcggca	aagtctccct	1200
cgtgggtgct	ggcatgaagt	ctcaccacgg	tgttaccgca	gagttcatgg	aagctctgcg	1260
cgatgtcaac	gtgaacatcg	aattgatttc	cacctctgag	attcgtatct	ccgtgctgat	1320
ccgtgaagat	gatctggatg	ctgctgcacg	tgcatcgcac	gagcagttcc	agctgggcgg	1380
cgaagacgaa	gccgtcgttt	atgcaggcac	cggacgctaa	agttttaaag	gagtagtttt	1440
acaatgacca	ccatcgcagt	tgttggtgca	accggccagg	tcggccagggt	tatgcgcacc	1500
cttttggaag	agcgcaatct	cccagctgac	actgttcggt	tctttgcttc	cccacgttcc	1560
gcaggccgta	agattgaatt	cgctgcacatc	gatgctcttc	tgcgtaatt	aacaattggg	1620
atcctctaga	cccgggattt	aaatcgctag	cgggctgcta	aaggaagcgg	aacacgtaga	1680
aagccagtcc	gcagaaacgg	tgctgacccc	ggatgaatgt	cagctactgg	gctatctgga	1740
caagggaaaa	cgcaagcgca	aagagaaagc	aggtagcttg	cagtgggctt	acatggcgat	1800
agctagactg	ggcggtttta	tggacagcaa	gcgaaccgga	attgccagct	ggggcgccct	1860
ctggtaaggt	tgggaagccc	tgcaaagtaa	actggatggc	tttcttgccg	ccaaggatct	1920
gatggcgag	gggatcaaga	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	cgcatgattg	1980
aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	ttcggctatg	2040
actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttcgggctg	tcagcgcagg	2100
ggcgcccgggt	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccgggtg	cctgaatgaa	ctgcaggacg	2160
aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct	gtgctcgacg	2220
ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgcggggg	caggatctcc	2280
tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaaag	tatccatcat	ggctgatgca	atgcggcggc	2340
tgcatacgtc	tgatccgggt	acctgcccac	tcgaccacca	agcgaaacat	cgcacgcagc	2400
gagcacgtac	tcggatggaa	gccgggtcttg	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcatc	2460
aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gcgcatgccc	gacggcgagg	2520

atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa	aatggccgct	2580
tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	cgcctatcag	gacatagcgt	2640
tggctacccg	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaaatg	ggctgaccgc	ttcctcgtgc	2700
tttacggtat	cgccgctccc	gattcgcagc	gcatcgcctt	ctatcgcctt	cttgacgagt	2760
tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcca	acctgccatc	2820
acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	tcgttttccg	2880
ggacgccggc	tggatgatcc	tccagcgcgg	ggatctcatg	ctggagttct	tcgcccacgc	2940
tagcggcgcg	ccggccggcc	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	3000
gcatcaggcg	ctcttccgct	tcctcgtca	ctgactcgtc	gcgctcggtc	gttcggctgc	3060
ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	3120
acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	3180
cgttgctggc	gtttttccat	aggtcccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	3240
caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	3300
gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggataacctg	tcgccttttc	3360
tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	3420
aggctcgttc	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	3480
ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggttaag	acacgactta	tcgccactgg	3540
cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatatgt	aggcggtgct	acagagttct	3600
tgaagtgggt	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	3660
tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	3720
ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	3780
aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	3840
aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	3900
gccgcggccg	ccatcggcct	tttcttttgc	gtttttattt	gttaactggt	aattgtcctt	3960
gttcaaggat	gctgtctttg	acaacagatg	ttttcttgcc	tttgatgttc	agcaggaagc	4020
tcggcgcaaa	cgttgattgt	ttgtctgcgt	agaatcctct	gtttgtcata	tagcttgtaa	4080
tcacgacatt	gtttcctttc	gcttgaggta	cagcgaagtg	tgagtaagta	aaggttacat	4140
cgttaggatc	aagatccatt	tttaacacaa	ggccagtttt	gttcagcggc	ttgtatgggc	4200
cagttaaaga	attagaaaca	taaccaagca	tgtaaataatc	gttagacgta	atgccgtcaa	4260
tcgtcatttt	tgatccgcgg	gagtcagtga	acaggtacca	tttgccgttc	attttaaaga	4320
cgttcgcgcg	ttcaatttca	tctgttactg	tgttagatgc	aatcagcggg	ttcatcactt	4380

```

ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccggtt gctaactcag 4440
ccgtgcggtt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgatatg gttgtcgctt gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttggtt tggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgctgc 4920
tgtcttttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggttttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcgct catgtctcct ttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt acaaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgct 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcatctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcatth cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaata tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 65

<211> 38

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 65

cggcaccacc gacatcatct tcacctgccc tcgttcgg

38

<210> 66
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 66

cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tggtgccg 38

<210> 67
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> gene lysC

<400> 67

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tctcgccttg agagtgcgga acgcattaga	60
aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc	120
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt	180
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc taacgctctc	240
gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct	300
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcgt	360
gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctgggtttcca ggggtgtaat	420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtgggt ctgacaccac tgcagttgcg	480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat	540
accgctgacc cgcgcacgtt tccaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa	600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtg tgcgcagtg tgaatacgt	660
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg	720
attgcgggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc	780
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg	840
aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc	900
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc	960
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac	1020
gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgtt	1080
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc	1140
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgac tggatgctgc tgcacgtgca	1200

```

ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga      1260
cgc                                                                    1263

<210> 68
<211> 5860
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Plasmídeo

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: pCIS sysC thr311ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (155)..(1420)
<223> lysC

<220>
<221> misc_feature
<222> (3935)..(5356)
<223> sacB (Bacillus subtilis) complemento

<220>
<221> misc_feature
<222> (5357)..(5819)
<223> Promotor sacB complemento

<220>
<221> misc_feature
<222> (1974)..(2765)
<223> kanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3032)..(3892)
<223> on-EC complemento

<400> 68

cccggtagca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc      60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt      120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg      180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac      240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga      300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct      360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg      420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg      480
aaacgcacgc attggtgatg tcaactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa      540
gatctgcatt gttgctggtt tccaggggtg taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt      600

```

gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt	660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa	720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggtc	780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt	840
acgctcgtct tatagtaatg atccccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatatcc	900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt	960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc	1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga	1080
catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct	1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct	1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctaccccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg	1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgatatt ccgtgctgat	1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg	1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt	1440
acaatgacca ccacgcgagt tggttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgcacc	1500
cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcggt tctttgcttc cccacgttcc	1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg	1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga	1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga	1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat	1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcct	1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct	1920
gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattggtg	1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg	2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg	2100
ggcgcccgggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg	2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg	2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc	2280
tgtcatctca ccttgctcct gccagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc	2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcacgcagc	2400
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc	2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg	2520

atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa	aatggccgct	2580
tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	gacatagcgt	2640
tggctacccg	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaaatg	ggctgaccgc	ttcctcgtgc	2700
tttacggtat	cgccgctccc	gattcgcagc	gcacgcctt	ctatcgctt	cttgacgagt	2760
tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcca	acctgccatc	2820
acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaggttg	ggcttcggaa	tcgttttccg	2880
ggacgccggc	tggatgatcc	tccagcgcg	ggatctcatg	ctggagttct	tcgcccacgc	2940
tagcggcgcg	ccggccggcc	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	3000
gcacagggcg	ctcttcgct	tctcgcctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	3060
ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	3120
acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	3180
cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcacacaaa	aatcgacgct	3240
caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	3300
gctccctcgt	gcgctctcct	gttcgcgacc	tgccgcttac	cggataacctg	tccgcctttc	3360
tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	3420
aggctcgttc	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	3480
ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggttaag	acacgactta	tcgccactgg	3540
cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatatgt	aggcggtgct	acagagttct	3600
tgaagtgggt	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atgttggtatc	tgcgctctgc	3660
tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	3720
ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	3780
aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	3840
aagggatatt	ggcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	3900
gccgcggccg	ccatcggcct	tttcttttgc	gtttttatct	gttaactggt	aattgtcctt	3960
gttcaaggat	gctgtctttg	acaacagatg	ttttcttgcc	tttgatgttc	agcaggaagc	4020
tcggcgcaaa	cgttgattgt	ttgtctgcgt	agaatcctct	gtttgtcata	tagcttgtaa	4080
tcacgacatt	gtttcctttc	gcttgaggta	cagcgaagtg	tgagtaagta	aaggttacat	4140
cgttaggata	aagatccatt	tttaacacaa	ggccagtttt	gttcagcggc	ttgtatgggc	4200
cagttaaaga	attagaaaca	taaccaagca	tgtaaataatc	gttagacgta	atgccgtcaa	4260
tcgtcatttt	tgatccgcgg	gagtcagtga	acaggtacca	tttgccgttc	attttaaaga	4320
cgttcgcgcg	ttcaatttca	tctgttaactg	tgtagatgc	aatcagcggg	ttcatcactt	4380

```

ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccggtt gctaactcag 4440
ccgtgcggtt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtagt gttgtcgctt gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacggttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tgggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgcg 4920
tgtcttttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg cttttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga ttttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgccgtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcgct catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgct 5580
tggtattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcattggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaata tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 69

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Old38

<400> 69

acatccatgg tggccgttac cctgcgaat

29

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Old 39

<400> 70

tgtatgtcct cctggacttc

20

<210> 71

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Old40

<400> 71

gaagtccagg aggacataca atgaccaaca tccgcgtagc

40

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Old 37

<400> 72

gaaaccacac tgtttccttg c

21

<210> 73

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Old 32

<400> 73

atcaacgcgt cgacaccaca tcatcaatca c 31

<210> 74

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: Old33

<400> 74

atcaccatgg gttcttgtaa tcctccaaaa ttg 33

<210> 75

<211> 6187

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Plasmídeo

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: pCIS Peftu ddh (pCLiK int sacs Peftu ddh)

<400> 75

tcgagctaaa ttagacgtcg cgtgcgatca gatcggtccaa gttctctggg gagagcaggt 60

atggagcaac ttcgaggacg gtgaaagctc cgctttggcc ctgctgcttc atgcggtgag 120

ctgcgcgacc gaaagcgatc tgtgaggaag cggtgaaatc tgggtttcgg tccagcttga 180

ggatgtattc cacggtgtgg ttgaagccac cgggtgctgcc ggtggtaatc acgtggccac 240

cgtgtggcat gccggtgtgc tcggagtcga aggttgcttc gtcgatgaag ttgacttcga 300

cttcgtagcc aacgaagtaa tcaggcatgg tgccgatgtc gttttcgatg cgctcgtgat 360

cgcccgctc ggcaaccacg aagcattggc gcttggtggg ttgctttccg gtaaggctgc 420

cggcttcgcc gcggcgggcc ttttccaggc cgtcttcgga tgggaggggt tactggactg 480

ccttttgaac gccagggatg cgtcgcaaag catcgagtg gccctgtgac aaacctgggc 540

cccagaaggt gtgctgctgg tgctcggcta agactgccgc tgcgtagacg cggttgatgg 600

agaacattcc tggatcccag ccggtagaga ccagtgaac gttgccggct gcggtggcgg 660

cttcgttcat gacctggcgg tggcgtggga tgctcgcggtg gttgtcgtag gtgtctacgg 720

tgcaggcgaa ctgcgcgaac tttggtgcct gctcagggat gtcggtggcg gagcccatgc 780

acaggaacag cacgtccacg tcgtcggcgt gcttgctccac gtcggcgaca tcaaagactg 840

gcgtctttgt gtcgaggggt gcccggcgcg agaagattcc tacaagggtcc atgtcgggct 900

gcttggcaat aagcttttcg acgctgcgtc ccaggtttcc gtagcccacg atagctacgc	960
ggatgttggg cattgtatgt cctcctggac ttcgtggtgg ctacgacttt cgcagccacg	1020
aattggtttt gctttcactg tgataagcag cctggaagac tgagcacaca gatctagcgc	1080
attacaaaat gtgccagtta ctgaatccta agggcaacgg cgttgatttt caaactacca	1140
gctaccctgt ggacattcgc agggtaacgg ccaccatggg ttcttgtaat cctccaaaat	1200
tgtggtggca ctgtcctggg cgagcttacc gagatgcata cttagatgat gattcagggg	1260
catctctttc atcaggaccg aaagcgaacg tttcgtattg ttgagccttt tggttccacc	1320
acggatgcgc tgatctattt tcatggctcc cagcagtcag gatctgtggg gcgcagcttc	1380
accaacagga cttttgatcc gttgccgttc atggtggttt atccggatgg ggtggatcag	1440
cattggaatg atgcgcggtt gggtttggat gaaaataccc gccatttagg cattgatgat	1500
gtggggttct ttgtaaaact cgccacgcac ttgggcaaca cgtatggcat caagaggatc	1560
tttattgttg gctattccaa cgggtgggcag atggtgttgc ggctcatgca tgaggttccc	1620
aagatgctca gtggcgctgc aaccattgca tccaacatgc cagttgcaga gaatacgctg	1680
ccgcaggtga aaaccttcaa gacacatccg gtgccttatt tggcgatggc tggaactgcc	1740
gatacttttt caccgtatga gggtagcgat gccggtattg gtcgcgaaca ccgccgtggc	1800
gtgggcatgt ccgcctttga ttcagctgcc tatattgccg cccgaaacgg actgaccgaa	1860
caccgccacg acgtgattga tgatgtggtg tcgacgcgtc atatgactag ttcggacct	1920
gggatatcgt cgacatcgat gctcttctgc gttaattaac aattgggatc ctctagaccc	1980
gggattttaa tcgctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca	2040
gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc	2100
aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgcag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc	2160
ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaagggttg	2220
gaagccctgc aaagtaaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg	2280
atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt	2340
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca	2400
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggtgtca gcgcaggggc gcccggttct	2460
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct	2520
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccctt gcgagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc	2580
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct	2640
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga	2700
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg	2760

gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc	2820
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcac ggcgaggatc tcgtcgtgac	2880
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat	2940
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta	3000
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgctttt acggtatcgc	3060
cgctccccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg	3120
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat	3180
tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg	3240
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg ccacgcctag cggcgcgccg	3300
gcgggccccg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc	3360
ttccgcttcc tcgctcactg actcgtgctg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc	3420
agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa	3480
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt	3540
tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg	3600
gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg	3660
ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag	3720
cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc	3780
caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccg tccagccgcac cgctgcgcct tatccggtaa	3840
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg	3900
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc	3960
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac	4020
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg	4080
tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt	4140
gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt	4200
catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta aaggccggcc gcggccgcca	4260
tcggcatttt cttttgcgtt tttatttggt aactgttaat tgtccttggt caaggatgct	4320
gtctttgaca acagatgttt tcttgccttt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaacgt	4380
tgattgtttg tctgcgtaga atcctctggt tgtcatatag cttgtaatca cgacattggt	4440
tcctttcgtc tgaggtacag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag	4500
atccattttt aacacaaggc cagttttggt cagcggcttg tatgggccag ttaaagaatt	4560
agaaacataa ccaagcatgt aaatatcggt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga	4620

tccgcgggag	tcagtgaaca	ggtaccat	ttt	gccgttcatt	ttaaagacgt	tcgcgcgttc	4680			
aat	ttcatct	gttactgtgt	tagatgcaat	cagcggtttc	atcacttttt	tcagtgtgta	4740			
atcatcg	ttt	agctcaatca	taccgagagc	gccgtttgct	aactcagccg	tcggtttttt	4800			
atcgct	tttgc	agaagttttt	gactttcttg	acggaagaat	gatgtgcttt	tgccatagta	4860			
tgctttgt	tta	aataaagatt	cttcgccttg	gtagccatct	tcagttccag	tg	tttgcttc	4920		
aaatactaag	tatt	ttgtggc	ctttatcttc	tacgtagtga	ggatctctca	gcgtatggtt	4980			
gtcgcctgag	ctgtagttgc	cttcacogat	gaactgctgt	acattttgat	acgtttttcc		5040			
gtcaccgtca	aagattgatt	tataatcctc	tacaccgttg	atgttcaaag	agctgtctga		5100			
tgctgatacg	ttaacttg	tg	ttgtgcag	tg	tttg	tttg	ccgtaatg	tt	taccggagaa	5160
atcagtgtag	aataaacgga	tttttccg	tc	agatgtaa	at	gtggctgaac	ctgaccattc		5220	
ttgtg	tttg	g	tcttttagga	tagaatcatt	tgcatcgaat	ttgtcgctgt	ctttaaagac		5280	
gcggccagcg	tttttccagc	tgtcaataga	agtttcgccg	actttttgat	agaacatgta		5340			
aatcgatgtg	tcacccgcat	ttttaggac	tccggcta	at	gcaaagacga	tgtggtagcc	5400			
gtgatag	ttt	gcgacagtgc	cgtcagcg	tt	gtaatggc	cagctgtccc	aaacgtccag	5460		
gccttttgca	gaagagatat	ttttaattgt	ggacgaatca	aattcagaaa	cttgatattt		5520			
ttcatttttt	tgctgttcag	ggatttgcag	catatcatgg	cgtgtaatat	gggaaatgcc		5580			
gtatgtttcc	ttatatggct	tttggttcgt	ttctttcgca	aacgcttgag	ttgcgcctcc		5640			
tgccagcagt	gcggtagtaa	agg	ttaatac	tg	ttgctt	gt	tttgcaaa	act	ttttgatgtt	5700
catcg	ttcat	gtctcctttt	ttatgtactg	tg	tttagcgg	ctgcttcttc	cagccctcct		5760	
gtttgaagat	ggcaagttag	ttacgcacaa	taaaaaaaga	cctaaaatat	gtaaggggtg		5820			
acgccaaagt	atacactttg	ccctttacac	atttttaggtc	ttgcctgctt	tatcagtaac		5880			
aaaccgcgc	gatttacttt	tcgacctcat	tctattagac	tctcg	tttg	attgcaactg	5940			
gtctat	ttttc	ctctttt	gtt	tgatagaaaa	tcataaaaagg	atttgcagac	tacgggccta	6000		
aagaactaaa	aatctatct	gtttcttttc	attctctgta	ttttttatag	tttctgttgc		6060			
atgggcataa	agttgccttt	ttaatcacia	ttcagaaaat	atcataatat	ctcatttcac		6120			
taaataatag	tgaacggcag	gtatatgtga	tgggttaaaa	aggatcggcg	gccgctcgat		6180			
ttaaatc							6187			

<210> 76

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature
 <223> designação interna: CK461

<400> 76

cctgacgtcg caatataggc agctgaatc

29

<210> 77

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: CE466

<400> 77

gcccaattgg ttcttgtaat cctccaaaa

29

<210> 79

<211> 26

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: CK426

<400> 78

cgccaattgt cgagggccgt taccct

26

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<220>

<221> misc_feature

<223> designação interna: CK463

<400> 79

gctacgcgga tggtggtcat gggtaaaaaa tcctttcgta

40

<210> 80

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

```

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: CR464

<400> 80

tacgaaagga ttttttacc atgaccaaca tccgcgtagc          40

<210> 81
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: CK467

<400> 81

agaccgggt tagacgtcgc gtgcgatca                      29

<210> 82
<211> 6233
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Plasmídeo

<220>
<221> misc_feature
<223> designação interna: pCIS PefTuPsod ddh = pClik int sacB PefTuPs
      od ddh

<400> 82

gggattttaa tgcctagcgg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca      60
gaaacgggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc     120
aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgacg tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc     180
ggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaagggttg      240
gaagccctgc aaagtaaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg     300
atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt     360
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca     420
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct     480

ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct      540
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc     600
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct     660
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga     720

```

tcgggctacc	tgcccatctcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	780
gatggaagcc	ggtcttgctg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	840
agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgc	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	900
ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	ctggattcat	960
cgactgtggc	cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctgta	1020
tattgctgaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	1080
cgctcccgat	tcgcagcgca	tcgcctttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	1140
actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgccaacc	tgccatcacg	agatttcgat	1200
tccaccgcgc	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	cgccggctgg	1260
atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccacgctag	cggcgcgccg	1320
gccggcccg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgctc	1380
ttcgccttcc	tcgctcactg	actcgtgcg	ctcggtcgtt	cggctgcggc	gagcggatc	1440
agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	1500
catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	1560
tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagagggtg	1620
gcgaaaccgc	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcgtgcg	1680
ctctcctggt	ccgaccctgc	cgtttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	1740
cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	tcgttcgctc	1800
caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccgt	tcagcccgc	cgctgcgcct	tatccggtaa	1860
ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	1920
taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cggtgctaca	gagttcttga	agtgggtggc	1980
taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	2040
cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaacaa	accaccgctg	gtagcgggtg	2100
tttttttggt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	2160
gatcttttct	acgggggtctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	2220
catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	gatcctttta	aaggccggcc	gcggccgcca	2280
tcggcatttt	cttttgcggt	tttatttggt	aactgttaat	tgtccttggt	caaggatgct	2340
gtctttgaca	acagatgttt	tcttgccctt	gatgttcagc	aggaagctcg	gcgcaaacgt	2400
tgattgtttg	tctgcgtaga	atcctctggt	tgcatatag	cttgtaatca	cgacattggt	2460
tcctttcgct	tgaggtagag	cgaagtgtga	gtaagtaaag	gttacatcgt	taggatcaag	2520
atccattttt	aacacaaggc	cagttttggt	cagcggcttg	tatgggccag	ttaaagaatt	2580

agaaacataa ccaagcatgt aaatatcggt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga	2640
tccgcgggag tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcgcgttc	2700
aatttcatct gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta	2760
atcatcgttt agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt	2820
atcgctttgc agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta	2880
tgctttgtta aataaagatt cttcgccttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc	2940
aaataactaag tatttgtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatgggt	3000
gtcgcctgag ctgtagttgc cttcacgat gaactgctgt acattttgat acgtttttcc	3060
gtcaccgta aagattgatt tataatcctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga	3120
tgctgatacg ttaacttgtg cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatgtt taccggagaa	3180
atcagtgtag aataaacgga tttttccgtc agatgtaa atgtggctgaac ctgaccattc	3240
ttgtgttttg tcttttagga tagaatcatt tgcacgaat ttgtcgtgt ctttaaagac	3300
gcggccagcg tttttccagc tgtcaataga agtttcgccg actttttgat agaacatgta	3360
aatcgatgtg tcacccgat ttttaggac tccggcta atgcaaagacga tgtggtagcc	3420
gtgatagttt gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag	3480
gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa cttgatattt	3540
ttcatttttt tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc	3600
gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc	3660
tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatgtt	3720
catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggc ctgcttcttc cagccctcct	3780
gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg	3840
acgccaaagt atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt tatcagtaac	3900
aaaccgcgcg gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttg attgcaactg	3960
gtctattttt ctcttttggt tgatagaaaa tcataaaagg atttgacagac tacgggccta	4020
aagaactaaa aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag tttctgttgc	4080
atgggcataa agttgccttt ttaatcaciaa ttcagaaaat atcataatat ctcatttcac	4140
taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat	4200
ttaaactctg agaggcctga cgtcgcaata taggcagctg aatcaaaggc ggacatgcc	4260
acgccacggc ggtgttcgcg accaataccg gcacgccac cctcatacgg tgaaaaagta	4320
tcggcagttc cagccatcgc caaataaggc accggatgtg tcttgaaggt tttcacctgc	4380
ggcagcgtat tctctgcaac tggcatgttg gatgcaatgg ttgcagcgcc actgagcatc	4440

ttgggaacct	catgcatgag	cgcgaacacc	atctgcccac	cgttggaata	gccaacaata	4500
aagatcctct	tgatgccata	cgtgttgccc	aagtgcgtgg	cgagttttac	aaagaacccc	4560
acatcatcaa	tgcctaaatg	gcgggtat	tttcatccaaac	ccaaccgcgc	atcattccaa	4620
tgctgatcca	ccccatccg	ataaaccacc	atgaacggca	acggatcaaa	agtccgtgtg	4680
gtgaagctgc	gccccacaga	tcctgactgc	tgggagccat	gaaaatagat	cagcgcaccc	4740
gtggtggaac	caaaaggctc	aacaatacga	aacgttcgct	ttcggctcctg	atgaaagaga	4800
tgtccctgaa	tcattcatcta	agtatgcac	tcggtaagct	cgaccaggac	agtgccacca	4860
caattttgga	ggattacaag	aaccaattgt	cgagggccgt	taccctgcga	atgtccacag	4920
ggtagctgg	agtttgaaaa	tcaacgccgt	tgcccttagg	attcagtaac	tggcacattt	4980
tgtaatgcgc	tagatctgtg	tgctcagct	tccaggctgc	ttatcacagt	gaaagcaaaa	5040
ccaattcgtg	gctgcgaaag	tcgtagccac	actagtagct	gccaattatt	ccgggcttgt	5100
gaccgcgtac	ccgataaata	ggtcggctga	aaaatttcgt	tgcaatatca	acaaaaaggc	5160
ctatcattgg	gaggtgtcgc	accaagtact	tttgcgaaagc	gccatctgac	ggattttcaa	5220
aagatgtata	tgctcgggtgc	ggaaacctac	gaaaggattt	tttaccatg	accaacatcc	5280
gcgtagctat	cgtgggctac	ggaaacctgg	gacgcagcgt	cgaaaagctt	attgccaagc	5340
agcccgacat	ggaccttgta	ggaatcttct	cgcgccgggc	caccctcgac	acaaagacgc	5400
cagtctttga	tgctcgccgac	gtggacaagc	acgccgacga	cgtggacgtg	ctgttcctgt	5460
gcatgggctc	cgccaccgac	atccctgagc	aggcaccaaa	gttcgcgcag	ttcgccctgca	5520
ccgtagacac	ctacgacaac	caccgcgaca	tcccacgcc	ccgccaggtc	atgaacgaag	5580
ccgccaccgc	agccgggaac	gttgcaactg	tctctaccgg	ctgggatcca	ggaatgttct	5640
ccatcaaccg	cgtctacgca	gcggcagct	tagccgagca	ccagcagcac	accttctggg	5700
gcccagggtt	gtcacagggc	cactccgatg	ctttgcgacg	catccctggc	gttcaaaagg	5760
cagtccagta	caccctccca	tccgaagacg	ccctggaaaa	ggcccgcgcg	ggcgaagccg	5820
gcgaccttac	cggaaagcaa	accacaagc	gccaatgctt	cgtgggttgc	gacgcggccg	5880
atcacgagcg	catcgaaaac	gacatccgca	ccatgcctga	ttacttcggt	ggctacgaag	5940
tcgaagtcaa	cttcatcgac	gaagcaacct	tcgactccga	gcacaccggc	atgccacacg	6000
gtggccacgt	gattaccacc	ggcgacaccg	gtggcttcaa	ccacaccgtg	gaatacatcc	6060
tcaagctgga	ccgaaaccca	gatttcaccg	cttcctcaca	gatcgctttc	ggtcgcgcag	6120
ctcaccgcat	gaagcagcag	ggccaaagcg	gagctttcac	cgtcctcgaa	gttgctccat	6180
acctgctctc	cccagagaac	ttggacgatc	tgatcgcacg	cgacgtctaa	ccc	6233

<210> 83

<211> 7

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> misc_feature

<223> sequência de ligação de ribossoma

<400> 83

aggagga

7

<210> 84

<211> 1365

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> misc_feature

<223> RAX077

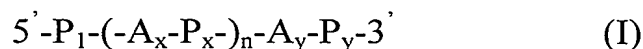
<400> 84

atgaatgatg agaattattca aagctccaac tatcagccat tcccagagttt tgacgattgg	60
aaacagatcg aggtgtcgct cttagatgtc atcgaatcct cacgccattt ttctgatttg	120
aaagatagca ctgatcggtt tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc	180
gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgoggttt tacccataca	240
gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag	300
cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga	360
actccaatct ctacgaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa	420
agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat	480
aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt	540
gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta	600
gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct	660
tttgacgatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat	720
cctgggtgtc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa	780
gcagcggaca agaataaccc gtcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat	840
actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaatac tggttcggct	900
aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat	960
aggctccaag aaagtatttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg	1020
aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt cccattcaa tctgccagag	1080
ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgaccttag ctttcaatag caactctcca	1140
aaacaaatct tccacccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc	1200
agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc	1260

gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320
gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

REIVINDICAÇÕES

1. Unidade de expressão recombinante compreendendo promotor múltiplo, caracterizada pelo fato de que compreende, na direção de 5' a 3', um módulo de seqüência da seguinte fórmula 1:



5 onde

n é um número inteiro de 0 a 10,

A_x e A_y são idênticos ou diferentes e são uma ligação química ou uma seqüência ligadora de ácido nucleico;

10 P_1 , P_x e P_y codificam seqüências promotoras idênticas ou diferentes a partir de bactérias corineformes iguais ou diferentes que compreendem pelo menos uma seção de ligação de RNA polimerase; e pelo menos P_y compreende uma seção de seqüência de terminal 3' que medeia a ligação de ribossoma.

15 2. Unidade de expressão, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que P_1 , P_x e P_y são em cada caso derivada a partir de uma seqüência contígua de 35 a 500 resíduos de nucleotídeo, que é localizada 5' a montante da seqüência codificadora para uma proteína no genoma do organismo.

20 3. Unidade de expressão, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que P_1 , P_x e P_y são, independentemente um do outro, selecionados dentre seqüências promotoras para a seqüência codificadora de uma proteína com alta abundância em um organismo.

25 4. Unidade de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que P_1 , P_x e P_y são, independentemente um do outro, selecionados dentre a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4.

5. Unidade de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que os promotores são

selecionados dentre promotores fortes, constitutivos ou reguláveis.

6. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende, na direção de 5' a 3', um módulo de sequência da seguinte fórmula II:



5 onde

n , A_x , A_y , P_1 , P_x e P_y são como definidos acima, e

G é pelo menos uma sequência codificadora de ácido nucleico que é funcionalmente ligada à sequência reguladora a montante de 5'.

7. Cassete de expressão, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que G é selecionado dentre

a. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos,

b. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de nucleotídeos e nucleosídeos,

15 c. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de ácidos orgânicos,

d. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de lipídeos e ácidos graxos,

20 e. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de dióis,

f. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de carboidratos,

g. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de compostos aromáticos,

25 h. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de vitaminas,

i. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de co-fatores, e

j. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do caminho biossintético de enzimas.

k. ácidos nucleicos que codificam uma proteína do metabolismo central.

- 5 8. Cassete de expressão, de acordo com a reivindicação 7a), caracterizado pelo fato de que os ácidos nucleicos que codificam as proteínas do caminho biossintético de aminoácidos, selecionadas dentre aspartato quinase, aspartato semialdeído desidrogenase, diaminopimelato desidrogenase, diaminopimelato descarboxilase, diidrodipicolinato sintetase, 10 diidrodipicolinato redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase, piruvato carboxilase, triosefosfato isomerase, regulador transcricional LuxR, regulador transcricional LysR1, regulador transcricional LysR2, malato-quinona oxidoredutase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, transcetolase, transaldolase, 15 homosserina O-acetiltransferase, cistationina gama sintase, cistationina beta liase, serina hidroximetiltransferase, O-acetil-homosserina sulfidrilase, metilenotetra-hidrofoliato redutase, fosfosserina aminotransferase, fosfosserina fosfatase, serina acetiltransferase, homosserina desidrogenase, homosserina quinase, treonina sintase, veículo exportador de treonina, 20 treonina desidratase, piruvato oxidase, exportador de lisina, biotina ligase, cisteína sintase I, cisteína sintase II, metionina sintase dependente da coenzima B12, metionina sintase independente da coenzima B12, atividade das subunidades 1 e 2 da sulfato adenililtransferase, fosfoadenosina fosfossulfato redutase, ferredoxina sulfito redutase, ferredoxina NADP 25 redutase, 3-fosfoglicerato desidrogenase, regulador de RXA00655, regulador de RXN2910, arginil-t-RNA sintetase, fosfoenolpiruvato carboxilase, proteína do efluxo de treonina, serina hidroximetiltransferase, frutose 1,6-bisfosfatase, proteína de redução de sulfato RXA077, proteína de redução de sulfato RXA248, proteína de redução de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-

fosfofrutoquinase, 6-fosfo-frutoquinase, tetraidropicolinato succinilase, succinil aminocetopimelato aminotransferase, succinil diaminopimelato dessuccinilase, diamino-pimelato epimerase, 6-fosfogliconato desidrogenase, glicose fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, aspartato transaminase e enzima de malato.

9. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um cassete de expressão como definido em qualquer uma das reivindicações de 6 a 8.

10. Microorganismo geneticamente modificado, caracterizado pelo fato de que é transformado com pelo menos um vetor como definido na reivindicação 9 ou que compreende pelo menos um cassete de expressão como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 8.

11. Microorganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é derivado de bactérias corineformes.

12. Microorganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que é derivado de bactérias do gênero *Corynebacterium* ou *Brevibacterium*.

13. Microorganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um cassete de expressão em uma forma integrada.

14. Processo para preparar um produto biossintético diferente de lisina, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar um microorganismo geneticamente modificado como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 13 e isolar o produto desejado da cultura.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o produto biossintético é selecionado dentre ácidos orgânicos, proteínas, nucleotídeos e nucleosídeos, aminoácidos tanto proteinogênicos quanto não proteinogênicos diferentes de lisina, lipídeos e

ácidos graxos, dióis, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas e cofatores, enzimas e proteínas.

16. Uso de uma unidade de expressão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de ser para regular uma biossíntese de produto diferente de lisina.

FIGURA 1

A) pEFTu

```
>EFTU\rx01284\
ggcggttaccctgcgaatgtccacagggtagctggtagtttgaaaatcaacgcccgttgccctaggattca
gtaactggcacattttgtaatgcgctagatctgtgtgctcagtccttcaggctgcttatcacagtgaagc
aaaaccaattcgtggctgcgaaagtcgtagccaccacgaagtccgggagggcataca
```

```
ggcggttaccctgcgaatgtccacagggtagctggtagtttgaaaatcaacgcccgttgccctaggattca
gtaactggcacattttgtaatgcgctagatctgtgtgctcagtccttcaggctgcttatcacagtgaagc
aaaaccaattcgtggctgcgaaagtcgtagccaccacgaagtccgggagggcataca
```

B) pGRO

```
>groES\rx00497\
cggcttaaagtttggtgccatgtgaatTTTTtagcaccctcaacagttgagtgtgctggcactctcggggg
tagagtgccaaataggttggttgacacacagttgttcacccgcgacgacggctgtgctggaaaccacaa
ccggcacacacaaaatttttctcatgggagggttcatc
```

```
cggcttaaagtttggtgccatgtgaatTTTTtagcaccctcaacagttgagtgtgctggcactctcggggg
tagagtgccaaataggttggttgacacacagttgttcacccgcgacgacggctgtgctggaaaccacaa
ccggcacacacaaaatTTTTTCAT
```

C) pEFTs

```
>elongationsfaktor \rx01913\
ccccacgacaatggaactttgacttttaaaatttcacgcgcgtgggggctttttgggcacagcccgc
cgtgtcgcaacgtaatcgactgaatacctgtacgatcacttttttagacgggcggtagggctactgtgcc
ctaacctaaagcttgtaaagcatttaattatccatacataaggagggctcgcgccgta
```

```
ccccacgacaatggaactttgacttttaaaatttcacgcgcgtgggggctttttgggcacagcccgc
cgtgtcgcaacgtaatcgactgaatacctgtacgatcacttttttagacgggcggtagggctactgtgcc
ctaacctaaagcttgtaaagcatttaattatccatacata
```

D) pSOD

```
>superoxid\dismutase\rx03119\
agctgccaattattccgggcttgtagcccgctacccgataaaataggtcggctgaaaaatttcggttgcaat
atcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtgcaccaagtacttttggaagcgccatctgacggattt
tcaaaagatgtatatgctcgggtgcggaacctaaggaggttttttaacc
```

```
agctgccaattattccgggcttgtagcccgctacccgataaaataggtcggctgaaaaatttcggttgcaat
atcaacaaaaaggcctatcattgggaggtgtgcaccaagtacttttggaagcgccatctgacggattt
tcaaaagatgtatatgctcgggtgcggaacctaC
```

RESUMO

“UNIDADE DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE COMPREENDENDO
PROMOTOR MÚLTIPLO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR,
MICROORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO, PROCESSO
5 PARA PREPARAR UM PRODUTO BIOSSINTÉTICO DIFERENTE DE
LISINA, E, USO DE UMA UNIDADE DE EXPRESSÃO”

A invenção diz respeito a promotores múltiplos e unidades de
expressão de gene, ao uso destes para regular a transcrição e expressão de
gene, aos cassetes de expressão contendo os ditos promotores múltiplos ou
10 unidades de expressão, aos vetores contendo os ditos cassetes de expressão,
aos microorganismos geneticamente modificados contendo os ditos vetores
e/ou as ditas unidades de expressão e aos métodos para preparar produtos
biossintéticos pelo cultivo de microorganismos geneticamente modificados.