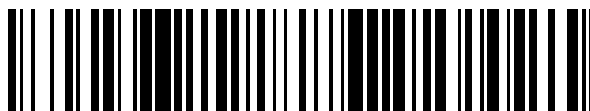


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 105**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2013 PCT/KR2013/000235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13105807**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2013 E 13735942 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2803727**

54 Título: **ARNs de regulación de síntesis y procedimiento de preparación del mismo**

30 Prioridad:

11.01.2012 KR 20120003609

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2019

73 Titular/es:

**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (100.0%)
373-1 Guseong-dong, Yuseong-gu
Daejeon 305-701, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YUP;
NA, DOKYUN y
YOO, SEUNG MIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 709 105 T3

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

DESCRIPCIÓN

ARNs de regulación de síntesis y procedimiento de preparación del mismo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo ARNs hecho a medida que reduce la expresión génica en células procariotas, a un procedimiento de preparación del mismo, y al uso del mismo, y más en particular, a un ARNs sintético que comprende un sitio de unión de Hfq, derivado del ARNs de MicC, y una región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana, y a un procedimiento de preparación del mismo y al uso del mismo.

Antecedentes de la técnica

- 10 En los últimos años, las preocupaciones a nivel mundial sobre temas ambientales y el agotamiento de los recursos limitados han aumentado rápidamente. Como alternativa para solucionar tales problemas, la construcción de sistemas de producción basados en organismos respetuosos con el medio ambiente y renovables ha sido de interés creciente. Tales sistemas se pueden construir mediante la regulación de vías metabólicas en organismos para optimizar los flujos metabólicos para los metabolitos deseados, y se requieren diversas técnicas de biología molecular en este procedimiento para regular vías metabólicas.

- 15 Los procedimientos para regular las vías metabólicas incluyen un procedimiento de aumentar la expresión de enzimas requeridas para los procedimientos biosintéticos para mejorar los flujos metabólicos, y un procedimiento de prevención de flujos metabólicos que se usan para el crecimiento celular y la producción de otros metabolitos y genes de delección con el fin de producir metabolitos deseados. Un procedimiento de delección génica que actualmente es ampliamente usado es un procedimiento en el que el gen a deleccionar se sustituye por cualquier secuencia homóloga a la misma usando recombinasa, de manera que la función del gen se pierde (Datsenko y col., PNAS, 97(12): 6640-6645, 2000). Sin embargo, este procedimiento de delección tiene los siguientes problemas.

- 20 En primer lugar, el tiempo requerido que es para la delección de genes es relativamente largo. Teniendo en cuenta el tiempo requerido para reemplazar el gen cromosómico con la secuencia homóloga y el tiempo requerido para eliminar un gen de resistencia a antibióticos, que se utiliza para seleccionar las células de las que se eliminó la eliminación del gen, del cromosoma, se requiere un tiempo de una semana o más para eliminar un gen. Este tiempo duradero en la delección génica interfiere con el desarrollo de la ingeniería metabólica centrado en la producción eficaz de metabolitos mediante la regulación de la vía metabólica, en comparación con la tecnología de la biología molecular que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años.

- 25 En segundo lugar, la delección génica provoca la pérdida completa de la función del gen. Esto sugiere que el nivel de expresión del gen no se puede regular a un nivel deseado. Con el fin de producir de forma eficaz un metabolito deseado en una vía metabólica intracelular, la delección génica trata de bloquear un flujo metabólico que va hacia la vía metabólica. Sin embargo, si el flujo metabólico bloqueado produce una sustancia esencial para el crecimiento celular, el crecimiento de las células en las que se deleccionó el gen se inhibirá significativamente o no tendrá lugar. Con el fin de maximizar la eficacia de la producción de un metabolito deseado, las células que producen el metabolito deseado se deberían cultivar fácilmente mientras que también se debe optimizar un flujo metabólico hacia el metabolito deseado. Por tanto, existe una necesidad por un procedimiento capaz de producir una sustancia deseada mientras que se mantiene el crecimiento celular regulando el nivel de expresión génica, en lugar de deleccionar simplemente el gen con el fin de regular el flujo metabólico.

- 30 En tercer lugar, el gen deleccionado del cromosoma mediante un procedimiento convencional de delección génica es difícil de restaurar. Además, si la delección del mismo gen se intenta en otras cepas, todos los procesos se deberían intentar de nuevo y, por lo tanto, se requerirían grandes cantidades de tiempo y esfuerzo.

- 35 Hiroshi Kawamoto y col: "Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq", MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 61, n.º 4, 1 de agosto de 2006 (01-08-2006), páginas 1013-1022, XP055157275, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05288.x desvela un análisis mutacional sistemático de los ARNs ptsG y SgrS que reveló que seis pares de bases alrededor de la secuencia SD de ptsG son particularmente importantes para la acción de SgrS y también se demostró *in vitro* que SgrS forma un dúplex estable con el ARNm de ptsG y que Hfq facilita notablemente la tasa de formación de dúplex.

- 40 Zhang Y y col: "Identifying Hfq-binding small RNA targets in Escherichia coli", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, EE.UU., vol. 343, n.º 3, 12 de mayo de 2006 (12-05-2006), páginas 950-955, XP024924800, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.02.196 desvela dianas de Hfq que se unen a pequeños ARN a escala genómica e identifican las dianas más conocidas reguladas negativamente de Hfq que se unen a los ARNs usando un nuevo algoritmo de alineación.

- 45 Coleman J et al: "The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes", CELL, CELL PRESS, EE.UU., vol. 37, n.º 2, 1 de junio de 1984 (01-06-1984), páginas 429-436, XP023912039, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/0092-8674(84)90373-8 desvela la construcción de plásmido que produce un ARN complementario al ARNm de E. coli lpp (ARN de mic[lpp]) y que la inducción del gen mic(lpp)

bloqueó eficazmente la producción de lipoproteína y redujo la cantidad de ARNm de lpp.

Vandana Sharma y col.: "Engineering Artificial Small RNAs for Conditional Gene Silencing in *Escherichia coli*", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 1, n.º 1, 29 de agosto de 2011 (29-08-2011), páginas 6-13, XP055205233, ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/sb200001q; y Vandana Sharma y col.: "Supporting Information: Engineering Artificial Small RNAs for Conditional Gene Silencing in *Escherichia coli* Supporting Figures", 25 de agosto de 2011 (25-08-2011), XP55205382, recuperado de internet: URL: <http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/sb200001q/suppl%20file/sb200001q%20SI001.pdf> [recuperado el 29-07-2015] desvela una estrategia para usar ARNs artificiales que pueden regular genes endógenos deseados en *Escherichia coli*. Usando un gen reportero que se fusionó de forma transitoria con una secuencia líder de ARNm 5' natural, los ARNs artificiales activos se seleccionaron de bibliotecas en las que los andamiajes de ARNs naturales se fusionaron a un dominio antisentido aleatorizado. Se anticipó que los ARNs artificiales serán útiles para el control dinámico y el ajuste de precisión de la expresión de genes endógenos en bacterias para aplicaciones en biología de síntesis.

S. Man y col.: "Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, n.º 8, 3 de febrero de 2011 (03-02-2011), páginas e50-e50, XP55205230, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr034; y Shuai Man y col.: "Supplementary Data: Artificial trans-encoded small noncoding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria", 3 de febrero de 2011 (03-02-2011), XP55205344, recuperado de internet: URL: http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2011/01/24/gkr034.DC1/revise/supplementary_data.pdf [recuperado el 29-07-2015] describe el uso de ARNs artificiales trans-codificados (ARNats) para el silenciamiento de genes específicos en bacterias. Se diseñó y se sintetizó una serie de ARNats que se dirige a genes específicos, y algunos de ellos suprimieron notablemente la expresión de genes diana de forma dependiente de Hfq.

S. Chen y col.: "MicC, a Second Small-RNA Regulator of Omp Protein Expression in *Escherichia coli*", Journal of Bacteriology, vol. 186, n.º 20, 15 de octubre de 2004 (15-10-2004), páginas 6689-6697, XP055358563 desvela que MicC, que se conserva en *Shigella*, *Salmonella*, y *Klebsiella*, inhibe la expresión de *ompC* a nivel postranscripcional.

Por tanto, con el fin de superar las limitaciones del procedimiento convencional de delección génica, debería ser posible reducir el nivel de expresión del gen de interés sin modificar la secuencia cromosómica de la cepa. Asimismo, debería ser posible regular el nivel de expresión del gen y aplicar fácilmente la regulación de la expresión del mismo gen a otras cepas. Además, se requiere construir y aplicar el sistema regulador del gen de forma rápida y conveniente.

Por consiguiente, los presentes inventores trataron de construir un ARNs sintético de longitud corta hecho a medida usando un procedimiento que satisface los requisitos descritos anteriormente.

Actualmente se conocen un total de 101 ARNs de *E. coli* (Pichon y col., Nucleic Acids Research, DOI:10.1093/nar/gkr1141, 2011), y actualmente se están estudiando los mecanismos de los mismos. Hasta la fecha se ha documentado que un gran número de ARNs forman una estructura secundaria específica, incluso aunque tengan diferentes secuencias y que la proteína Hfq reconoce y se une a los ARNs. Las funciones de Hfq son aumentar la semivida del ARNs para que el ARNs funcione de manera eficaz incluso en una pequeña cantidad, y ayudar a la unión del ARNs al ARNm diana para que el ARNm diana funcione de manera rápida, y unir RNasa al ARNm diana para promover la degradación del ARNm diana para reducir de este modo la expresión génica de forma más eficaz.

Las funciones básicas del ARNs de *E. coli* se han estudiado constantemente, pero hay pocos o no hay informes del uso de los mecanismos descritos anteriormente para construir ARNs sintéticos. De acuerdo con los informes actuales de la construcción de ARNs de *E. coli*, se han construido ARNs eficaces mediante mutagénesis aleatorizada y cribado (Sharma y col, ACS Synthetic Biology, DOI: 10.1021/sb200001q, 2011).

Por consiguiente, los presentes inventores han hecho un gran esfuerzo para construir un nuevo ARNs sintético de cadena corta y hecho a medida con el fin de superar las limitaciones del procedimiento convencional de delección génica, y como resultado, han construido un ARNs sintético que comprende un sitio de unión de Hfq, que deriva de MicC y una región homóloga al ARNm diana tal como ARNm de DsRed2, ARNm de AraC, ARNm de KanR o ARNm de LuxR, y han descubierto que los resultados del ensayo para la expresión del ARNm diana indican que se puede construir un ARNs eficaz sin recaer en los procedimientos aleatorios convencionales. Además, los presentes inventores han construido ARNs sintéticos que inhiben la expresión de *tyrR* (regulador de tirosina), *csrA* (regulador del almacenamiento de carbono), *pgi* (glucosa-6-fosfato isomerasa), *ppc* (fosfoenolpiruvato carboxilasa) y similares, y han descubierto que estos ARNs muestran efectos similares a los de la delección génica real y se pueden usar para regular la producción de un metabolito deseado, completando por tanto la presente invención.

Divulgación de la invención

PROBLEMA TÉCNICO

Es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo ARNs sintético de cadena corta hecho a medida, que supere las limitaciones del procedimiento convencional de la delección génica y que se pueda usar para regular la

expresión del ARNm de diversos genes diana con alta eficacia, un procedimiento de preparación de los mismos y el uso de los mismos.

SOLUCIÓN TÉCNICA

5 Con el fin de conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona un ARNs (ARN regulador pequeño) para la inhibición de la expresión génica en procariotas, comprendiendo el ARNs:

- (i) un sitio de unión a Hfq del ARNs de MicC; y
- (ii) una región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana

10 en la que la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana se construye de forma que la energía de unión al ARNm del gen diana esté en el intervalo de -20 kcal/mol a -40 kcal/mol; y
 en la que la región que empareja sus bases con los pares de bases del ARNm del gen diana con parte del sitio de unión del ribosoma del ARN del gen diana y la región tiene una longitud de 19-37 nucleótidos.

La presente invención también describe un ácido nucleico aislado que codifica el ARNs.

La presente invención también describe un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado que codifica el ARNs.

15 La presente invención también proporciona un microorganismo recombinante que tiene el ARNs introducido en el mismo.

La presente invención también se refiere al ARNs tal como se define anteriormente, en el que el ARNm del gen diana es un ARNm de un gen seleccionado del grupo que consiste en el gen de resistencia a la kanamicina, regulador de tirosina, fosfoenolpiruvato carboxilasa, regulador del almacenamiento de carbono, glucosa-6-fosfato isomerasa, citrato sintasa, acetil-CoA carboxiltransferasa, subunidad alfa, proteína biotinilada transportadora de biotina-carboxilo, acetil-CoA carboxilasa, acetil-CoA carboxiltransferasa, subunidad beta, piruvato deshidrogenasa, actividad de propionato cinasa / acetato cinasa, adiY, acetilglutamato cinasa, N-acetilglutamilfosfato reductasa, argininosuccinato sintasa, argininosuccinato liasa, aspartato amoniaco-liasa, fosfopentomutasa, desoxirribosa-fosfato aldolasa, KASIII, -cetoacil-ACP sintetas, acil-CoA sintetasa grasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, transportador de APC, 4-aminobutirato aminotransferasa, subunidad A de glutamato descarboxilasa, subunidad B de glutamato descarboxilasa, transportador de APC GABA, glicerol cinasa, represor de sn-Glicerol-3-fosfato, fructosa 1,6-bisfosfatasa II, citrato sintasa, regulador de lisogenización, acetohidroxiбутаноato sintasa / acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomeroreductasa, dihidroxiácido deshidratasa, acetolactato sintasa / acetohidroxiбутаноato sintasa, acetohidroxiбутаноato sintasa / acetolactato sintasa, UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina deacetilasa, L-aspartato oxidasa, regulador de respuesta de nitrato/nitrito, fosfoenolpiruvato carboxicinas, fosfoenolpiruvato sintetasa, fosfato acetiltransferasa, adenilosuccinato sintetasa, adenilosuccinato liasa, 4-aminobutirato aminotransferasa, transportador ABC de ribosa, ribosa piranasa, ribocinasa, alfa-cetoglutarato reductasa / D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, fosfohidroxitreonina aminotransferasa / 3-fosfoserina aminotransferasa, glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa, asparagina sintetasa A, carbamoil fosfato sintetasa, D-alanina-D-alanina ligasa B, timidina fosforilasa / uracil fosforilasa, L-2-hidroxiglutarato oxidasa, Lipoamida deshidrogenasa, O-succinilhomoserina liasa / O-succinilhomoserina(tiol)-liasa, aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa, fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido transferasa, UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato 2,6-diaminopimelato ligasa, enzima de adición de D-alanil-D-alanina, N-acetilglucosaminil transferasa, quinolinato sintasa, pantotenato sintetasa, Aspartato 1-descarboxilasa, 6-fosfogluconolactonasa, dihidroorotasa, ribulosa fosfato 3-epimerasa, transaldolasa A, aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa, homoserina cinasa, treonina sintasa, transcetolasa I y transcetolasa II.

La presente invención también proporciona un microorganismo recombinante transformado con el vector de expresión.

45 La presente invención también describe un procedimiento para preparar un ARNs, comprendiendo el procedimiento la unión de un ácido nucleico, que codifica una región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana, con un ácido nucleico que codifica un sitio de unión de Hfq derivado del ARNs de MicC.

La presente invención también proporciona un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el procedimiento las etapas de: introducir o expresar el ARNs en un procariota; e inhibir la expresión del ARNm del gen diana.

50 La presente invención también describe una composición para inhibir la expresión génica en procariotas, comprendiendo la composición el ARNs tal como se define anteriormente.

La presente invención también proporciona un procedimiento de selección de un gen que necesita ser delecionado para producir una sustancia útil, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) inhibir la expresión de al menos un gen entre los genes, que están presentes en una cepa para la producción

de la sustancia útil y participa en la vía de biosíntesis de la sustancia útil, usando el ARNs tal como se define anteriormente que direcciona al gen; y

(b) seleccionar el gen cuya expresión se inhibió, como el gen que necesita ser delecionado para producir la sustancia útil, en el caso en el que el rendimiento de la producción de la sustancia útil aumenta mediante la inhibición de la expresión del gen.

La presente invención también proporciona un procedimiento para mejorar una cepa para producir una sustancia útil, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) inhibir la expresión de al menos un gen entre los genes, que están presentes en una cepa para la producción de la sustancia útil y participa en la vía de biosíntesis de la sustancia útil, usando el ARNs tal como se define anteriormente que direcciona al gen;

(b) seleccionar el gen cuya expresión se inhibió, como el gen que necesita ser delecionado para producir la sustancia útil, si el rendimiento de la producción de la sustancia útil aumenta mediante la inhibición de la expresión del gen; y

(c) construir una cepa recombinante que tiene una deleción del gen seleccionado o una combinación de los genes seleccionados.

La presente invención también proporciona un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir tirosina, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la inactivación de las funciones de los genes tyrR y crsA en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina, en la que las funciones de los genes tyrR y crsA se inactivan mediante la introducción o la expresión de un ARNs sintético tal como se define anteriormente en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina para inhibir la expresión de los genes tyrR y crsA y, en el que el microorganismo recombinante comprende dicho ARNs sintético.

La presente invención también proporciona un microorganismo recombinante que tiene una capacidad para producir fenol, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la introducción o amplificación de un gen tpl en el microorganismo recombinante descrito anteriormente.

La presente invención también describe un procedimiento para producir un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir tirosina, comprendiendo el procedimiento la inactivación de las funciones de los genes tyrR y crsA en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina.

La presente invención también proporciona un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir cadaverina, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la inactivación de la función de al menos un gen en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de cadaverina, en la que las funciones de los genes se inactivan mediante la introducción o la expresión de un ARNs sintético tal como se define anteriormente en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de cadaverina para inhibir la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en murE, metB, thrL y ackA y, en el que el microorganismo recombinante comprende dicho ARNs sintético.

La presente invención también describe un procedimiento para producir un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir cadaverina, comprendiendo el procedimiento la inactivación de la función de al menos un gen, seleccionado de murE, metB, thrL y ackA.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un procedimiento para la selección de estructuras básicas para la función eficaz de los ARNs sintéticos.

La FIG. 2 muestra las secuencias de SgrS (referencial), MicC y MicF (referencial), la secuencia del ARNm de DsRed2 reportero y una secuencia complementaria que se une al SUR de la misma.

La FIG. 3 es un diagrama gráfico que muestra la inhibición de la expresión de DsRed2 después de la unión por complementariedad entre MicC, MicF (referencial) o SgrS (referencial) y el SUR de DsRed2.

La FIG. 4 muestra diversas secuencias complementarias que se unen a DsRed2.

La FIG. 5 es un diagrama gráfico que muestra el grado de inhibición de DsRed2 tras la unión del sitio de unión de Hfq de MicC a diversas secuencias complementarias que se unen a DsRed2.

La FIG. 6 muestra las secuencias de ARNm de AraC, LuxR y KanR y las secuencias complementarias al SUR que se unen a los ARNs sintéticos para unirse a las mismas.

La FIG. 7 es un diagrama gráfico que muestra la reactividad cruzada entre AraC, LuxR o KanR y un ARNs sintético que inhibe AraC, LuxR o KanR.

La FIG. 8 muestra los resultados de calcular la energía de unión entre AraC, LuxR o KanR y un ARNs sintético, construido para unirse a AraC, LuxR o KanR, usando el programa informático mfold.

La FIG. 9 muestra la vía de biosíntesis de tirosina en un microorganismo. En la FIG. 9, el recuadro verde indica el gen a sobreexpresar, el recuadro rojo indica el gen a silenciar por un ARNs sintético, y θ indica la eliminación de la inhibición de retroalimentación.

La FIG. 10 es una visión esquemática de un plásmido construido para la producción de tirosina.

La FIG. 11 es un diagrama gráfico que muestra los resultados obtenidos mediante la amplificación de la expresión de los genes asociados a la vía de biosíntesis de tirosina para la producción de tirosina, la inhibición de la expresión de *tyrR*, *ppc*, *csrA* y *pgi* con ARNs sintéticos, y después comparando la producción de tirosina en diversas cepas de *E. coli* (*pgi* también incluye un ARNs sintético adicional (anti-*pgi*-DI, -D2) cuya expresión se reguló).

La FIG. 12 muestra las curvas de crecimiento de las cepas S17-1 y TOP10 de acuerdo con los ARNs sintéticos anti-*pgi*-DI y anti-*pgi*-D2.

La FIG. 13 muestra las secuencias de unión de anti-*pgi*, anti-*pgi*-DI y anti-*pgi*-D2.

La FIG. 14 es un diagrama gráfico que muestra la inhibición de la expresión de un gen diana en S17-1 y TOP10 por anti-*tyrR*, anti-*csrA*, anti-*ppc*, anti-*pgi*, anti-*pgi*-DI y anti-*pgi*-D2.

La FIG. 15 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la fermentación de los microorganismos recombinantes S17-1 (pTyr-a(anti-*csrA*), pTyr-b(anti-*tyrR*)).

La FIG. 16 es un diagrama gráfico que muestra las concentraciones de fenol producidas en diversas cepas de *E. coli*.

La FIG. 17 muestra la vía de biosíntesis de cadaverina en *E. coli*. El recuadro rojo indica los genes diana que se van a silenciar por ARNs sintético.

La FIG. 18 es una visión esquemática que muestra un plásmido que se va a transformar para aumentar la producción de cadaverina.

La FIG. 19 es un diagrama gráfico que muestra los cambios en la producción de cadaverina tras la introducción de ARNs sintéticos (el control contiene un plásmido de p15CadA en una cepa XQ56 y no contiene ARNs sintético. La concentración de cadaverina en el control es 1,3 g/l).

La FIG. 20 es una visión esquemática de un vector pWA.

La FIG. 21 es una visión esquemática de un vector pR15CA.

La FIG. 22 muestra el principio de funcionamiento de un ARNs sintético.

La FIG. 23 muestra los resultados experimentales obtenidos mediante la preparación de ARNs sintéticos, que inhiben la expresión de los genes *DsRed2* y *LacZ* con diversas energías de unión, y que examinan si el uso de los ARNs sintéticos regulan la expresión de los genes a diversos niveles.

La FIG. 24 muestra los resultados de un experimento realizado para examinar si la introducción de ARNs inhibe la expresión de las proteínas y el crecimiento celular en microorganismos.

La FIG. 25 muestra los resultados de examinar la producción de tirosina usando Anti-*csrA* con diversas energías de unión. La FIG. 26 muestra los resultados de medir la producción de tirosina después de introducir ARNs sintéticos que inhiben los genes implicados en las vías metabólicas clave de las células.

La FIG. 27 muestra la vía de biosíntesis de cadaverina en *E. coli* y la concentración de cadaverina producida tras la inhibición por los ARNs sintéticos.

La FIG. 28 muestra los resultados de medir los efectos de los ARNs sintéticos anti-*murE* que tienen diversas energías de unión en la producción de cadaverina.

La FIG. 29 muestra los resultados de un experimento realizado para examinar si diversos ARNs sintéticos influyen en la producción real de proteína *MurE*.

La FIG. 30 muestra los resultados de la fermentación de una cepa final que contiene anti-*murE*.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia a la que la invención pertenece entiende habitualmente. En general, la nomenclatura usada en el presente documento es bien conocida y se usa comúnmente en la materia.

La definición de los términos principales usados en la descripción detallada de la invención es tal como sigue.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNs" (s de ARN *small*, pequeño), se refiere a un ARN de longitud corta, que normalmente es de 200 nucleótidos o menos de longitud, no se traduce a proteína e inhibe de forma eficaz la traducción de un ARNm específico mediante unión por complementariedad.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión de ribosoma (SUR)" se refiere a un sitio en el que se une el ribosoma al ARNm para la transcripción del ARNm.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" pretende tener el significado más amplio, y el gen puede codificar una proteína estructural o una proteína reguladora. En el presente documento, la proteína reguladora incluye un factor transcripcional, una proteína de choque térmico, o una proteína que está implicada en la replicación, transcripción y/o traducción de ADN/ARN. Asimismo, el gen diana cuya expresión se va a inhibir puede estar presente como un elemento extracromosómico.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un nuevo ARNs regulador de la síntesis de longitud corta. Es decir, la presente invención se dirige a un ARNs (ARN regulador pequeño) para la inhibición de la expresión génica en procariotas, comprendiendo el ARNs:

- (i) un sitio de unión a Hfq del ARNs de *MicC*; y

(ii) una región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana

en la que la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana se construye de forma que la energía de unión al ARNm del gen diana esté en el intervalo de -20 kcal/mol a -40 kcal/mol; y
 en la que la región que empareja sus bases con los pares de bases del ARNm del gen diana con parte del sitio de unión del ribosoma del ARN del gen diana y la región tiene una longitud de 19-37 nucleótidos.

En la presente invención, se seleccionaron las estructuras que garantizan la función estable de los ARNs sintéticos, y después se seleccionó un sitio de unión para la inhibición más eficaz de la expresión del ARNm diana. Asimismo, se examinó si es posible preparar ARNs sintéticos para inhibir los ARNm diana que no fuesen ARNm de DsRed2. Además, se realizó un ensayo de reactividad cruzada para examinar si el ARNs construido puede inhibir la expresión de ARNm que no fuesen el ARNm diana. Como resultado, se desarrollaron nuevas estructuras de ARNs sintético de acuerdo con la presente invención y un procedimiento de preparación de las mismas.

En primer lugar, con el fin de establecer secuencias estructurales que se unen a Hfq para la función estable de los ARNs sintéticos e inhibir de manera eficaz la expresión de los genes diana, se seleccionó un grupo de candidatos de estructura de ARNs adecuados para el fin a partir de 101 ARNs presentes en *E. coli*, y se realizaron operaciones continuas de selección, seleccionando finalmente de este modo tres ARNs (FIG. 1).

Los tres ARNs seleccionados son MicC, SgrS (referencial) y MicF (referencial). MicC se une al ARNm de OmpC que ayuda en el paso de iones o de sustancias hidrófilas a través de la membrana celular de *E. coli*. SgrS se une al ARNm de la proteína PtsG que está presente en la membrana celular y sirve para transferir glucosa, y MicF se une a e inhibe la expresión del ARNm de la proteína de membrana OmpF que pasa aminoácidos, iones, azúcares y similares, que tienen un peso molecular de 600 Da o menos (Wadler y col., PNAS, 104(51):20254-20459, 2007; Chen y col., J. Bacteriology, 186(20): 6689, 2004).

En un ejemplo de la presente invención, los sitios de los tres ARNs, que se unen al ARNm diana, se eliminaron, y se construyeron los ARNs para su unión al SUR del ARNm de DsdRed2 para medir la capacidad de los ARNs para inhibir la expresión (FIG. 2). En la FIG. 2, la secuencia de unión a ARNm diana de cada uno de los ARNs candidatos está subrayada y se indica mediante color rojo, y se reemplazó con la secuencia indicada por Anti-DsRed2. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "SUR de DsRed2" se refiere a un sitio de unión real que está cubierto fisiológicamente por el ribosoma, que se une al ARNm de manera que el sitio no puede ser reconocido por otras proteínas. El SUR se define como una región de 36 pb desde el punto inicial de la secuencia de Shine-Dalgarno en la dirección del extremo 3'. Se puede predecir usando los resultados de los estudios documentados previamente (Na y col., BMC Systems Biology, 4(1):71, 2010). Los ARNs sintéticos construidos inhibieron la expresión de DsRed2 al 86 % cuando se usó el sitio de unión de Hfq de SgrS (referencial), al 85 % cuando se usó el sitio de unión de Hfq de MicF (referencial), y al 90 % cuando se usó el sitio de unión de Hfq de MicC (FIG. 3). Por tanto, en la presente invención, preferentemente se usó el sitio de unión de Hfq de MicC.

En otro ejemplo de la presente invención, se examinó de forma experimental si diversas secuencias localizadas alrededor del SUR de la secuencia de ARNm del gen diana eran adecuadas como sitios de unión. De manera específica, a partir de los ARNs sintéticos que se unen al SUR del ARNm diana, se construyeron ARNs que se unen al SUR, una parte del mismo, o regiones que no fueran el SUR, y estos sitios de unión tenían diversas longitudes de 19 a 37 nucleótidos (FIG. 4). Como resultado, se mostró que los ARNs sintéticos que se unen a al menos una parte del SUR mostraron un efecto inhibitorio de al menos el 90 % y que los ARNs sintéticos que no se unen al SUR también tenían una eficacia inhibitoria del 47-90 % (FIG. 5). En otras palabras, los ARNs que se unen a al menos una parte del SUR presentan excelentes efectos inhibidores de la expresión. Por tanto, en la presente invención, la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana puede emparejar sus bases con parte del SUR del ARNm del gen diana y tiene una longitud de 19 a 37 nucleótidos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "empareja sus pares de bases con parte" significa que se emparejan las bases con el SUR del ARNm del gen diana con una energía de unión de -30 kcal/mol o más (aproximadamente 20 nucleótidos o más) y también significa un emparejamiento de bases con parte del SUR del ARNm del gen diana o una región localizada alrededor de la misma, tal como se muestra en la FIG. 4. En el presente documento, la región que empareja sus bases con el SUR consiste en uno o más nucleótidos, y preferentemente 9 o más nucleótidos. En la presente invención, cuando un ARNs sintético se une a regiones que no sean el SUR, el efecto de los mismos puede ser relativamente bajo, pero este ARNs sintético también se puede usar para regular el nivel de expresión. Mientras tanto, incluso cuando la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana tiene diversas longitudes de 19-37 nucleótidos, el ARNs de acuerdo con la presente invención mostró efectos inhibidores de la expresión. Por tanto, la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana puede tener un tamaño mínimo que puede emparejar sus bases con el gen diana. La región tiene una longitud de 19-37 nucleótidos.

En otro ejemplo de la presente invención, se descubrió que, cuando un sitio que no se une al ARNm del gen diana se formó mediante la delección de uno o dos nucleótidos de la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana, se podía regular el grado de inhibición de la expresión. Por tanto, en la presente invención, se puede formar un sitio que no se une al ARNm del gen diana se formó mediante la delección o la sustitución de uno o más nucleótidos en la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana. Además, también se puede formar un sitio que no se une al ARNm de la diana mediante la inserción o la delección de uno o más nucleótidos en la región

que empareja sus bases con el ARNm del gen diana. En el presente documento, con el fin de emparejar las bases con el ARNm del gen diana, se deberían delecionar, sustituir o insertar 1-10 nucleótidos, preferentemente 1-5 nucleótidos de manera que la energía de unión esté entre -30 kcal/mol y -13 kcal/mol.

En otro ejemplo de la presente invención, se realizó un experimento para examinar si el ARNs sintético no solo inhibe simplemente la expresión del ARNm diana, sino que también regula la expresión a diversos niveles para regular la producción de proteína a diversos niveles, regulando de este modo las vías metabólicas celulares de forma más precisa. De manera específica, se construyó un ARNs sintético que inhibe la expresión del gen DsRed2, y un ARNs sintético que inhibe la expresión del gen lacZ. Asimismo, se construyeron ARNs sintéticos para unirse a cada ARNm con una energía de unión que varía de 0 a -60 kcal/mol, y se midió el grado de inhibición de la expresión del ARNm diana por cada uno de los ARNs sintéticos (FIG. 23). Como resultado, se podría ver que, en el intervalo de aproximadamente -10 kcal/mol a -40 kcal/mol, la expresión del ARNm diana se redujo de forma lineal, y a -40 kcal/mol o menos, no tuvo lugar una reducción adicional en la expresión. Esto indica que, cuando el ARNs sintético de acuerdo con la presente invención se construye para que se una al ARNm diana con una energía de unión que varía de -10 kcal/mol a -40 kcal/mol, puede inhibir la expresión del ARNm diana a un nivel deseado. Por tanto, en la presente invención, la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana se construye de forma que la energía de unión al ARNm del gen diana esté en el intervalo de -20 kcal/mol a -40 kcal/mol.

Mientras tanto, cuando el ARNs sintético se introduce adicionalmente en un plásmido con el fin de regular la expresión del gen diana y se produce en células, el ARNs puede interferir con el crecimiento de las células mediante el uso de la fuente de energía de las células. Por tanto, en otro ejemplo de la presente invención, se examinó si el ARNs sintético introducido de forma adicional tiene alguna influencia en el crecimiento celular y en la expresión de proteínas intracelulares (FIG. 24). Se introdujeron 0, 1, 2, 3 y 4 ARNs sintéticos en un plásmido que tiene un origen de replicación ColE1, y se midió el cambio en el nivel de expresión del gen DsRed2 en el plásmido. Como resultado, se pudo ver que la introducción de hasta tres ARNs sintéticos no influyó en la expresión de DsRed2 (FIG. 24b). Asimismo, se midió si la introducción de 0, 1, 2, 3, y 4 ARNs sintéticos tiene alguna influencia sobre la tasa de crecimiento de las células. En este caso, se midió la densidad óptica (a 600 nm) en la fase de crecimiento logarítmico de las células y se ajustó en la siguiente ecuación de la curva de crecimiento celular para calcular la constante de crecimiento celular (k) por tiempo:

$$y=y_0 \exp(k \cdot t)$$

en la que y_0 es el valor D.O.600 inicial y t es el tiempo. Como resultado, se podría ver que, cuando se introdujeron hasta tres ARNs sintéticos, el valor de k se redujo ligeramente, pero la reducción no fue significativa. Esto indica que la introducción de hasta tres ARNs en las células no influye de manera significativa en el crecimiento de las células (FIG. 24c).

En otro ejemplo de la presente invención, se realizó un experimento para examinar si se podía construir otros ARNs sintéticos para inhibir otros ARNm diana basándose en el procedimiento descrito anteriormente para la construcción de ARNs sintético y si los efectos inhibidores de los otros ARNs sintéticos eran suficientes. Por ejemplo, se construyeron ARNs sintéticos para inhibir el ARNm de AraC, KanR y LuxR que no fuese de DsRed2 (FIG. 6). Se hicieron combinaciones de los tres ARNs y tres genes, y se examinó la inhibición de la expresión por cada una de las combinaciones. Para este examen, la proteína DsRed2 se fusionó con cada uno de los genes para emitir fluorescencia roja. Los resultados del experimento indicaron que las tasas de inhibición de la expresión de los ARNm diana por los ARNs fueron uniformes (el 80-86 %) y que la expresión de otros ARNm no difirió del caso en el que se no se usó ARNs sintético.

Se estimó la energía de unión entre los tres ARNs sintéticos y el respectivo ARNm diana. Como resultado, la energía de unión de la diana pretendida estaba en el intervalo de -53,7 a -59,5 kcal/mol, mientras que la energía de unión a otros ARNm estaba en el intervalo de -12,2 a -13,5 kcal/mol. Los resultados del análisis indican que, cuando la energía de unión al ARNm diana es de aproximadamente -50 kcal/mol o menos y la energía de unión a otros ARNm es de -13 kcal/mol o mayor, el ARNs puede inhibir de manera suficiente solo la diana deseada sin reactividad cruzada. En otras palabras, el ARNs sintético construido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se caracteriza porque inhibe de manera suficiente la expresión del ARNm diana y no inhibe la expresión de otros ARNm.

Debe de entenderse que el SUR del ARNm transcrito puede se predecir de manera suficiente de los resultados de los estudios previamente documentados y que se puede hacer ARNs sintético construido a partir de MicC para unirse a cualquier ARNm.

Asimismo, será obvio para los expertos en la materia que el procedimiento para preparar ARNs sintético de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a genes que no sean DsRed2, AraC, kanR y LuxR, incluidos en los ejemplos de la presente invención, del mismo modo, y por lo tanto, el ámbito de la presente invención no se limita a estos genes. Además, de los resultados del estudio mencionado anteriormente que indican que los sitios SUR se pueden predecir en procariotas del mismo modo y que el ARNs se conserva evolutivamente en procariotas, se puede ver que el procedimiento para preparar el ARNs sintético también se aplica a otros procariotas, incluyendo *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*,

Aggregatibacter, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*, y *Cyclobacterium*, además de *E. coli*.

En la presente invención, el sitio de unión de Hfq derivado del ARNs de MicC se puede localizar sucesivamente desde la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana o se puede unir a la región mediante un enlazador tal como un fragmento de ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, "emparejar sus bases" significa un emparejamiento de bases entre las secuencias de ácido nucleico. La región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana puede tener una secuencia complementaria de aproximadamente el 70-80 % o más, preferentemente aproximadamente el 80-90 % o más, e incluso más preferentemente el 95-99 % o más, con el ARNm del gen diana.

Además, el ARNs de la presente invención se puede sintetizar de acuerdo con un procedimiento general, pero no se limita al mismo. En otras palabras, el ARNs se puede sintetizar químicamente o enzimáticamente.

El ARNs de acuerdo con la presente invención puede comprender una modificación química. La modificación química puede ser la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de al menos un nucleótido incluido en el ARNs mediante uno cualquiera de un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo -O-alquilo, un grupo -O-acilo y un grupo amino. Además, la modificación química también puede ser la sustitución del grupo hidroxilo mediante uno cualquiera de -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N3 y -CN (R=alquilo, arilo o alquilenos) con el fin de aumentar la capacidad para administrar el ARNs. Además, la modificación química puede ser la sustitución de la estructura principal de fosfato de al menos un nucleótido por uno cualquiera de una forma de fosforotioato, una forma de fosforoditioato, una forma de alquilfosfonato, una forma de fosforoamidato y una forma de boranofosfato. Además, la modificación química puede ser la sustitución de al menos un nucleótido incluido en el ARNs mediante uno cualquiera de LNA (del inglés *locked nucleic acid*, ácido nucleico bloqueado), UNA (del inglés, *unlocked nucleic acid*, ácido nucleico desbloqueado), morfolino y PNA (ácido peptidonucleico).

En otro aspecto, la presente invención describe un ácido nucleico aislado que codifica el ARNs, y un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado que codifica el ARNs.

En la presente invención, "ácido nucleico" puede ser ARN, ADN, ARN estabilizado o ADN estabilizado. Tal como se usa en el presente documento, el término "codificante" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNs y complementaria al ARNs.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" significa una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN unida de forma operativa a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un hospedador adecuado. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente una posible inserción genómica. Una vez que se incorpora en un hospedador adecuado, el vector se puede replicar y funcionar de manera independiente del genoma del hospedador o, en algunos casos, se puede integrar en el propio genoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan a veces de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Para los fines de la presente invención, preferentemente se usa un vector de plásmido. Un vector de plásmido que se puede usar para este fin contiene: (a) un origen de replicación mediante el cual, la replicación tiene lugar de forma eficaz, de manera que se crean varios cientos de vectores de plásmido por célula hospedadora; (b) un gen de resistencia a antibióticos mediante el cual, las células transformadas con el vector del plásmido se pueden seleccionar; y (c) sitios de corte de enzima de restricción en los que se pueden insertar fragmentos de ADN extraño. Incluso si los sitios adecuados de corte de enzimas de restricción no están presentes en el vector, el uso de un adaptador o enlazador convencional de oligonucleótidos sintéticos permite la unión fácil entre el vector y los fragmentos de ADN extraño. Tras la unión, el vector se debería transformar en células hospedadoras adecuadas. La transformación se puede lograr fácilmente mediante el procedimiento del cloruro de calcio o la electroporación (Neumann, y col., EMBO J., 1:841, 1982). Como el vector que se usa para la expresión de ARNs de acuerdo con la presente invención, se puede usar un vector de expresión conocido en la materia.

Una secuencia de nucleótidos se une de manera operativa cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. La secuencia de nucleótidos puede ser un gen y una(s) secuencia(s) de control enlazadas para ser capaces de expresar el gen cuando se une a una(s) secuencia(s) de control (por ejemplo, proteína de activación de la transcripción). Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretor está unido de manera operativa a ADN que codifica un polipéptido cuando se expresa como preproteína que participa en la secreción de polipéptido; un promotor o un potenciador está unido de manera operativa a una secuencia codificante cuando afecta a la transcripción de la secuencia; y un SUR está unido de manera operativa a una secuencia codificante cuando afecta a la transcripción de la secuencia o a una secuencia codificante cuando se dispone para facilitar la traducción. En general, el término "unido de manera operativa" se refiere a que las secuencias unidas de ADN son contiguas, y en el caso de la líder secretora, son contiguas y están presentes en un marco de lectura. Sin embargo, un potenciador no es necesariamente contiguo. El enlace entre estas secuencias se realiza mediante ligamiento en un sitio conveniente de enzimas de restricción. Sin embargo, cuando no existe el sitio, se usa un adaptador de oligonucleótido sintético o un enlazador de acuerdo con un procedimiento convencional.

En otro aspecto más, la presente invención se dirige a un microorganismo recombinante transformado con el vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el ARNs tal como se define anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "transformación" significa que el ADN se puede replicar como un factor fuera del cromosoma o por medio de la finalización de todo el cromosoma mediante la introducción de ADN en un hospedador.

Por supuesto, debería entenderse que no todos los vectores funcionan igual al expresar secuencias de ADN de acuerdo con la presente invención. De manera similar, no todos los hospedadores funcionan del mismo modo con respecto al mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia se puede seleccionar de forma apropiada entre diversos vectores, secuencias de control de la expresión y hospedadores sin salir del ámbito de la presente invención o portar una excesiva carga experimental. Por ejemplo, se debe seleccionar un vector considerando un hospedador, dado que el vector se debe replicar en el hospedador. De manera específica, el número de copias del vector, la capacidad de regulación del número de copias y la expresión de las otras proteínas codificadas por el correspondiente vector (por ejemplo, la expresión de un marcador de antibióticos) también se debería de considerar.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a la inhibición eficaz de la expresión de un gen intracelular sin delección del gen para cambiar el flujo de las vías metabólicas para aumentar de este modo la producción de un metabolito deseado. En un ejemplo de la presente invención, se descubrió que el flujo de las vías metabólicas se puede regular de forma artificial mediante la inhibición de la expresión de un gen diana intracelular usando el ARNs sintético, mediante lo cual se pueden producir tirosina y fenol con alta eficacia en *E. coli*. En otro ejemplo de la presente invención, se descubrió que se puede producir cadaverina con alta eficacia en *E. coli* usando el mismo principio. Por consiguiente, la presente invención se dirige a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el procedimiento las etapas de: la introducción o expresión del ARNs tal como se define anteriormente en un procariota; y la inhibición de la expresión del ARNm del gen diana.

En otro aspecto más, la presente invención se dirige a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el procedimiento las etapas de: la introducción o expresión del ARNs tal como se define anteriormente en un procariota; e inhibir la expresión del ARNm del gen diana.

Preferentemente, la expresión del ARNs se puede inducir mediante un promotor que opera de acuerdo con la unión de un inductor tal como arabinosa o se puede inhibir mediante un factor de transcripción termosensible tal como cl.

De manera específica, para la expresión correcta del ARNs sintético, la expresión del ARNs se puede regular doblemente usando un inductor exógeno y un factor de transcripción termosensible. De manera específica, el ARNs sintético se puede expresar mediante el promotor PR del fago lambda, y la expresión del mismo se puede controlar de manera segura usando la concentración de arabinosa y la temperatura expresando la proteína termosensible cl(ts2) de un promotor pBAD.

El ARNs de acuerdo con la presente invención se puede usar para seleccionar un gen que necesita ser delecionado para producir una sustancia útil. El procedimiento para seleccionar el gen que necesita ser delecionado para producir una sustancia útil comprende la etapa de: (a) inhibir la expresión de al menos un gen entre los genes, que están presentes en una cepa para la producción de la sustancia útil y participa en la vía de biosíntesis de la sustancia útil, usando el ARNs tal como se define anteriormente que direcciona al gen; y (b) seleccionar el gen cuya expresión se inhibió, como el gen que necesita ser delecionado para producir la sustancia útil, si el rendimiento de la producción de la sustancia útil aumenta mediante la inhibición de la expresión del gen. Tal como se usa en el presente documento, el término "delecionado" se refiere a incluir mutar, sustituir o delecionar parte del gen de interés o introducir uno o más nucleótidos en el gen, o introducir un gen, una enzima o una sustancia química, que inhibe la expresión o la actividad de la enzima de interés, inhibiendo de este modo la actividad de la enzima. Además, el gen seleccionado para ser delecionado también se puede usar para mejorar la cepa para producir la sustancia útil.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un procedimiento para mejorar una cepa para producir una sustancia útil, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) inhibir la expresión de al menos un gen entre los genes, que están presentes en una cepa para la producción de la sustancia útil y participa en la vía de biosíntesis de la sustancia útil, usando el ARNs tal como se define anteriormente que direcciona al gen;

(b) seleccionar el gen cuya expresión se inhibió, como el gen que necesita ser delecionado para producir la sustancia útil, si el rendimiento de la producción de la sustancia útil aumenta mediante la inhibición de la expresión del gen; y

(c) construir una cepa recombinante que tiene una delección del gen seleccionado o una combinación de los genes seleccionados.

En un ejemplo de la presente invención, se descubrió que, cuando se inhibió la expresión de *tyrR* y *csrA* en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina usando el ARNs de acuerdo con la presente invención, aumentó la producción de tirosina en la célula.

Aún en un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir tirosina, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la inactivación de las funciones de los genes *tyrR* y *csrA* en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina, en la que las funciones de los genes *tyrR* y *csrA* se inactivan mediante la introducción o la expresión de un ARNs sintético tal como se define anteriormente en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina para inhibir la expresión de los genes *tyrR* y *csrA* y, en la que el microorganismo recombinante expresa el ARNs sintético tal como se define anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inactivación de la función" se refiere a incluir mutar, sustituir o delecionar parte del gen de interés o introducir uno o más nucleótidos en el gen, o introducir un gen, una enzima o una sustancia química, que inhibe la expresión o la actividad de la enzima de interés, inhibiendo de este modo la actividad de la enzima. Por tanto, un procedimiento de inactivación de la función de un gen específico no se limita a ningún procedimiento particular, siempre que la actividad del gen específico de interés y la actividad de la enzima que está codificada por el gen se inhiben por procedimientos convencionales, incluyendo la inhibición de la expresión mediante ARN antisentido, recombinación homóloga, recombinación homóloga mediante la expresión de diversas enzimas recombinantes (lambda recombinasa, etc.) y la inserción de una secuencia específica usando transcriptasa inversa y ARN.

Además, en un ejemplo de la presente invención, se construyó un plásmido recombinante, que sobreexpresa los siguientes genes implicados en la biosíntesis de tirosina (FIG. 10): *ppsA* que codifica la polícétido sintasa A de tipo I de síntesis de fenoltiocerol; *tktA* que codifica la transcetolasa; *aroG* y *aroF* que codifican la 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa; *aroK* que codifica la shikimato cinasa I; *tyrA* que codifica la corismato mutasa; y *tyrC* que codifica la prefenato deshidrogenasa derivada de *Zymomonas mobilis*. Particularmente, la presente invención proporciona un plásmido recombinante construido mediante la realización de mutagénesis de sitio dirigido de uno o más restos de aminoácidos en *aroG* y *tyrA* resistentes a la retroalimentación para aumentar la activación de la vía metabólica de tirosina (*aroG* A146N y *tyrA* A354V/M53I, LutkeEversloh y col., Applied Microbiology and Biotechnology, 75:103, 1999).

El plásmido recombinante construido tal como se describe anteriormente se transformó en 14 cepas diferentes de *E. coli* (cepas K-12 (C600, DH5 α , ER2925, JM110, MG1655, S17-1, T1R (One shot(R) ccdB SurvivalTM2 T1R, Invitrogen), TG1, TOP10, W3110, XL1-Blue), cepa B (BL21(DE3), cepa W y un híbrido (HB101) de las cepas K-12 y B)), y después se midió la producción de tirosina en cada una de las cepas transformadas (FIG. 11).

Aunque 14 cepas microbianas que pertenecen al género *Escherichia* se ilustran en la presente invención, el ámbito de la presente invención no se limita a estas 14 cepas microbianas, dado que es evidente que el ARNs sintético y el plásmido recombinante de la presente invención funcionan del mismo modo en *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium* y *Cyclobacterium*.

Se puede ver que las cepas mostraron diferentes capacidades para producir tirosina, incluso aunque la vía de biosíntesis de tirosina se activó mediante la misma vía de biosíntesis. Esto sugiere que incluso las cepas que pertenecen a la especie *E. coli* tienen diferentes actividades intracelulares. Por tanto, esto indica que, para el diseño metabólico, la producción de un compuesto deseado en todas las cepas diferentes se debería examinar con el fin de alcanzar el máximo rendimiento del compuesto deseado. Por consiguiente, se puede ver que es difícil realizar este examen modificando la secuencia cromosómica de acuerdo con el procedimiento convencional lento de delección. Por lo tanto, se puede ver que la tecnología de reducir la expresión de un gen diana de forma similar al procedimiento de delección génica sin modificar la secuencia cromosómica, es decir, la tecnología del ARNs sintético de acuerdo con la presente invención, es altamente útil.

En la presente invención, el ARNs sintético de anti-*tyrR* que se dirige al ARNm de *tyrR* se clonó en el plásmido recombinante construido tal como se describe anteriormente, y se examinaron del mismo modo los efectos de los mismos en 14 cepas diferentes. Cada uno de los tres ARNs sintéticos restantes que regulan otros flujos metabólicos se clonaron en el mismo plásmido recombinante, y se examinaron los efectos de los mismos en combinación (FIG. 11). Como resultado, se podría ver que, cuando se inhibió *tyrR*, la producción de tirosina en la mayoría de las cepas aumentaba. Sin embargo, cuando se introducía adicionalmente un ARNs sintético que inhibe la expresión de *pgi* o *pgi*, la producción de tirosina se reducía en lugar de aumentar. Particularmente, se podría ver que, cuando se inhibía la expresión de *pgi*, la tasa de crecimiento de la cepa de *E. coli* se reducía de manera significativa, y por este motivo, disminuía la producción global de tirosina en la cepa.

En la presente invención, el grado de inhibición de la expresión del gen *pgi* se diversificó más con el fin de equilibrar el crecimiento de la célula hospedadora y el flujo metabólico a tirosina, aumentando de este modo la producción global de tirosina. A tal fin, parte de la secuencia de unión del gen regulador de la síntesis anti-*pgi* se delecionó con el fin de reducir la capacidad de unión. De manera específica, como se muestra en la FIG. 13, se delecionaron uno o dos nucleótidos de la secuencia de unión, y después se observaron los cambios en el crecimiento celular y en la producción de tirosina. Como resultado, como se puede ver en la FIG. 11, a medida que el grado de inhibición del

gen disminuía, la producción de tirosina aumentó, mientras que la tasa de crecimiento de la célula hospedadora también aumentó. Con respecto a esto, la FIG. 12 muestra una cepa S17-1 que tiene la mayor capacidad para producir tirosina y una cepa TOP10 que tiene la menor capacidad para producir tirosina.

5 A través de los procedimientos descritos anteriormente realizados en la presente invención, se descubrió que la cepa S17-1 de *E. coli* en la que se inhibió la expresión de los genes *tyrR* y *csrA* mostró la mayor capacidad para producir tirosina (2 g/l).

Se realizó la fermentación usando la cepa recombinante S17-1 construida en la presente invención, y como resultado, se demostró que la producción de tirosina podría alcanzar hasta 21,9 g/l (FIG. 15).

10 Con el fin de verificar la producción del compuesto deseado, la tirosina varía en función de la capacidad metabólica de las células incluso para el mismo diseño metabólico y para demostrar que el ARNs sintético construido inhibe eficazmente la expresión de su ARN diana, se midieron los grados de inhibición de expresión del ARN diana en las cepas S17-1 y TOP10 (FIG. 14). Como resultado, se demostró que la expresión del ARNm diana en las dos cepas se inhibía de forma eficaz en aproximadamente el 80-90 %. Esto indica que el ARNs sintético presenta efectos inhibidores similares independientemente de las cepas.

15 En la presente invención, se descubrió que el ARNs sintético se puede usar para regular los flujos metabólicos y que, debido a esta ventaja de que elimina la necesidad de modificar la secuencia cromosómica, las cantidades de producción de tirosina causadas por la inhibición de la expresión del gen diana en diversas cepas de *E. coli* se pueden determinar de manera eficaz al mismo tiempo.

20 En la presente invención, se clonó adicionalmente la tirosina fenol liasa (TPL) en el plásmido construido con el fin de cambiar la tirosina a fenol y producir fenol. Asimismo, el plásmido construido se introdujo en las 14 cepas diferentes de *E. coli* probadas tal como se describe anteriormente, y después se midió la producción de fenol en las cepas de *E. coli*. Como resultado, se demostró que la producción de fenol en la cepa W3110 era de 357,6 mg/l, y que la producción de fenol en la cepa S17-1 que mostró la mayor capacidad para producir tirosina era 68,8 mg/l. Esta es la primera producción exitosa de fenol en *E. coli*.

25 En otro aspecto más, la presente invención se dirige a un microorganismo recombinante que tiene una capacidad para producir fenol, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la introducción o la amplificación de un gen *tpl* en el microorganismo recombinante descrito anteriormente.

30 En otro ejemplo de la presente invención, se examinó si un flujo metabólico se puede regular mediante el ARNs sintético para aumentar la producción de cadaverina. A tal fin, la cepa recombinante de W3110 (XQ56) documentada por producir cadaverina a través de la vía biosintética de lisina se usó como una cepa básica (FIG. 17) (Qian y col., Biotechnology and Bioengineering, 108(1): 93-103, 2011). La cepa básica ya incluía un plásmido recombinante p15CadA, y el ARNs sintético se clonó en el plásmido separado pWAS y se transformó en la cepa (FIG. 18).

35 Con el fin de aumentar la cantidad de metabolitos requeridos para la producción de cadaverina, se seleccionaron los siguientes ocho genes candidatos a inhibir: *glTA* (citrato sintasa), *thrA* (aspartato cinasa I), *thrB* (homoserina cinasa), *thrC* (treonina sintasa), *thrL* (péptido líder de operón *thr*), *metB* (cistationina gamma sintasa), *murE* (UDP-N-acetilmuramoi-L-alanil-D-glutamato-L-lisina ligasa), y *murF* (UDP-N-acetilmuramoi-L-alanil-D-glutamato-L-lisina ligasa).

40 Tras la transformación con el plásmido recombinante que contiene el ARNs sintético construido, se midió la producción de cadaverina. La producción de cadaverina en la cepa básica fue de $1,4 \pm 0,05$ g/l, y cuando se tomó como el 100 %, las cepas en las que las expresiones de cada uno de *murE*, *metB* y *thrL* entre los ocho genes candidatos estaban inhibidos mostraron aumentos en la producción de cadaverina del 55 % (2,15 g/l) para *murE*, el 24 % (1,73 g/l) para *metB* y el 34 % (1,87 g/l) para *thrL* (FIG. 19).

45 En otro ejemplo de la presente invención, se realizó el mismo experimento en 130 genes candidatos, y como resultado, como se muestra en la FIG. 27, se descubrió que la inhibición de la expresión de un total de 37 genes enumerados en la Tabla 5 dieron como resultado un aumento en la producción de cadaverina. La producción de cadaverina en la cepa básica fue de $1,4 \pm 0,05$ g/l, y cuando se tomó como el 100 %, las cepas en las que las expresiones de cada uno de los genes *murE* y *ack* estaba inhibida mostraron aumentos en la producción de cadaverina del 55 % (2,15 g/l) para *murE* y del 40 % (1,96 g/l) para *ack* (FIG. 27).

50 Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se dirige a un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir cadaverina, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la inactivación de la función de al menos un gen, en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de cadaverina, en la que las funciones de los genes se inactivan mediante la introducción o la expresión de un ARNs sintético tal como se define anteriormente en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de cadaverina para inhibir la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en *murE*, *metB*, *thrL* y *ackA*.

55 Preferentemente, el microorganismo recombinante se obtiene mediante la inactivación de la función de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en *murE*, *metB*, *thrL* y *ackA*. Los ejemplos de una célula hospedadora que

tiene la vía de biosíntesis de cadaverina incluyen *E. coli*, *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*, y *Cyclobacterium*.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Examen del rendimiento del ARNs sintético

1-1: Construcción de ARNs sintético y construcción del plásmido pWAS para la regulación de la expresión

Se construyó un plásmido básico tal como se muestra en la FIG. 18, en el que se inhibió la expresión de un ARNs sintético, pero se podría expresar de forma eficaz si se requería.

En el plásmido pWAS de la FIG. 18, el ARNs sintético se puede construir mediante la inserción de una región de unión al ARNm del gen diana en un promotor (P_R) y una región de unión de Hfq MicC mediante mutagénesis de sitio dirigido.

Las enzimas de restricción usadas en este Ejemplo y en los siguientes Ejemplos se encargaron a New England Labs (EE.UU.) y la polimerasa de la PCR se encargó a Invitrogen (EE.UU.). Otros reactivos se indicaron por separado.

En primer lugar, la PCR se realizó usando un plásmido pKD46 (GenBank AY048746.1 (Datsenko y col., PNAS, 97(12): 6640-6645, 2000)) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 2 y 3, y el promotor araC-PBAD se clonó en un plásmido pWA (FIG. 20, SEQ ID NO: 1) usando SacI/EcoRI. Asimismo, se realizó la PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 4 y 5 del cromosoma del fago lambda (Bioneer, Corea; GenBank NC_001416.1), y se obtuvo el gen cl mediante escisión con PacI/EcoRI y después se unió. Además, se clonó adicionalmente una secuencia T1/TE como una secuencia de terminación de la transcripción en el plásmido tras la realización de la PCR. En el presente documento, la secuencia T1/TE se obtuvo mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 6 y 7 sin molde, y se escindió con EcoRI/XbaI y después se unió al vector que contiene araC-pBAD-cl introducido en el mismo, de manera que la terminación de cl se pudiese terminar. Usando como molde el vector construido anteriormente, se amplificó la T1/TE mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 8 y 9, después de lo cual se escindió con XhoI/KpnI y se unió al vector construido anteriormente, de manera que la transcripción del ARNs podría terminar de forma independiente. Se realizó la mutagénesis de sitio dirigido usando el vector construido como un molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 10 y 11, modificando de este modo el gen cl de tipo silvestre al gen cl mutante termosensible (ts2).

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 2] 5'-AAGCTGGAGC TCAATACTAG TCGATTTATT

ATGACAACCTT GACGGCTACA TC-3'

[SEQ ID NO: 3] 5'-GAATTCAATT AATTAATTAA AATTCCCAAA

AAAACGGGTA TGGAGAA-3'

[SEQ ID NO: 4] 5'-GGGAATTTTA ATTAAAAGGA GACCCGGGAT

ATGAGCACAA AAAAGAAACC ATTAACA-3'

[SEQ ID NO: 5] 5'-AATTATGAAT TCTTAGCCAA ACGTCTCTTC AGG-

3'

[SEQ ID NO: 6] 5'-AATAT GAATTCCTCAG GCATCAAATA AAACGAAAGG
CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC
GCTCTCTACT AGAGTC-3'

[SEQ ID NO: 7] 5'-AATAT TCTAGATATA AACGCAGAAA GGCCACCCG
AAGGTGAGCC AGTGTGACTC TAGTAGAGAG CGTTCACCGA CAAACAACAG
ATAAAACGAA AG-3'

[SEQ ID NO: 8] 5'-TTTTTCTCG AGCCAGGCAT CAAATAAAAC GAA-
3'

[SEQ ID NO: 9] 5'-GAATTGGGTA CCTATAAACG CAGAAAGGCC CACC-
3'

5 [SEQ ID NO: 10] 5'-gAAGTTAT CGCTAGTCAG TGGCC -3'
[SEQ ID NO: 11] 5'-CCCCACAACG GAACAACCTCT -3'

10 A continuación, se construyó una secuencia para su uso como una estructura a base de ARNs sintético y un
promotor PR mediante PCR del siguiente modo. Para una estructura de MicC, se realizó la PCR usando el
cromosoma de *E. coli* W3110 (GenBank AP009048) como un molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 12 y 13, y el
producto de la PCR se clonó usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen), se secuenció y después se unió al
vector construido anteriormente usando PstI/XhoI. Para una estructura de SgrS (referencial), se realizó la PCR
usando el mismo molde que antes y los cebadores de las SEQ ID NO: 14 y 15, y el producto de la PCR se clonó
usando un kit de clonación TOPO, se secuenció y después se clonó en el vector construido anteriormente usando
PstI/XhoI. Para una estructura de MicF (referencial), se realizó la PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 16 y
15 17 sin molde, y el producto de PCR se clonó usando un kit de clonación TOPO, se secuenció y después se clonó en
el vector usando PstI/XhoI. De esta manera, se pudieron construir tres vectores que tienen estructuras
fundamentales diferentes. Cada una de las estructuras de ARNs se muestra en la FIG. 2. Se realizó una PCR para
conformar la clonación en este plásmido o la secuenciación usando los cebadores de las SEQ ID NO: 18 y 19.

Secuencias de los cebadores usados

20 [SEQ ID NO: 12] 5'-CTGCAGGAAT TCTAACACCG TCGTGTTGA
CTATTTTACC TCTGGCGGTG ATAATGGTTG CTTTCTGTTG GGCCATTGCA TTGC-
3'

[SEQ ID NO: 13] 5'-CTCGAGAAAA AAAGCCCGGA CGACTGTTC-3'

[SEQ ID NO: 14] 5'-CTGCAGGAAT TCTAACACCG TCGTGTTGA
CTATTTTACC TCTGGCGGTG ATAATGGTTG CGATGAAGCA AGGGGGTGC-3'

[SEQ ID NO: 15] 5'-CTCGAGAAAA AAAACCAGCA GGTATAATCT
GCTG-3'

[SEQ ID NO: 16] 5'-CTGCAGGAAT TCTAACACCG TCGTGTTGA
CTATTTTACC TCTGGCGGTG ATAATGGTTG CTCATTTCTG AATG-3'

[SEQ ID NO: 17] 5'-TCGAGAAAAA AAACCGAATG CGAGGCATCC
GGTTGAAATA GGGGTAAACA GACATTCAGA AATGAGCAAC CATTATCAC-3'

[SEQ ID NO: 18] 5'-AGTGGGAACC TAGACACTAA-3'

[SEQ ID NO: 19] 5'-CTAGGTAAAC CCAGGAGG-3'

- 5 Como resultado, se construyó el plásmido pWAS tal como se muestra en la FIG. 20. El promotor PR es un promotor de fago lambda y cl(ts2) es un gen del fago lambda que funciona para suprimir el promotor PR y es una proteína mutante termosensible que normalmente opera a 25 °C y que pierde su función a 37 °C (Jana y col., Protein Engineering, 13(3): 225-233, 1999). Cuando se cultivó el plásmido en medio LB que contiene arabinosa al 1 % (triptona al 1 %, NaCl al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %) a 25 °C, se expresó cl(ts2) lo suficiente y su función se mantuvo intacta, y por lo tanto, suprime el promotor PR de manera que el ARNs sintético no se expresa. Sin embargo, cuando el plásmido se cultivó a 37 °C en ausencia de arabinosa, no se expresó suficiente cl(ts2) y pierde su función debido a su inestabilidad a la temperatura y por lo tanto, fracasa al suprimir el promotor PR, de manera que se expresa ARNs sintético.

1-2: Construcción del plásmido reportero para probar el rendimiento del ARNs sintético

- 15 Se construyó un plásmido reportero para examinar la función del ARNs sintético. Un plásmido básico para clonar un reportero fue pR15CA. La estructura del plásmido básico se muestra en la FIG. 21, y la secuencia del mismo se establece en la SEQ ID NO: 20.

- 20 T1/TE que es la secuencia de terminación de la transcripción del gen reportero se amplificó mediante PCR usando el plásmido pWAS (construido en el Ejemplo 1-2) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 21 y 22, y el producto de la PCR se escindió con XhoI/KpnI y después se clonó en un plásmido pR15CA. El promotor lac para la expresión del gen DsRed2 se amplificó usando pBluescript SK+ (Stratagene) como molde y los cebadores de las SEQ ID NOS: 23 y 24, y el producto de la PCR se clonó en el plásmido usando EcoRI/XhoI. Finalmente, el gen DsRed2 se amplificó mediante PCR usando pDsRed2-N1 (Clontech) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 25 y 26, y el producto de la PCR se clonó en el vector pR15CA usando PacI/XhoI, construyendo así un plásmido reportero.

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 21] 5'-ATAATTCTCG AGCCAGGCAT CAAATAAAAC
GAAAGGCT-3'

[SEQ ID NO: 22] 5'-AATTAGGTAC CTATAAACGC AGAAAGGCCC ACC-
3'

[SEQ ID NO: 23] 5'-AATTA
GAATTCGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTG-3'

- 30 [SEQ ID NO: 24] 5'-AATTACTCGA GAATTATTTA ATTAATAAAG
TTAATTTTTT TTTTTTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTC-3'

[SEQ ID NO: 25] 5'-AATTATTAAT TAAAAGGAGG ACAAATATAT
GGCGAGC-3'

[SEQ ID NO: 26] 5'-AATTACTCGA GTTACGCCAC CAGGGCATAG

TTTTCATCAT TTGCCGCCAG GAACAGGTGG TGGCGGCCCT CGGT-3'

1-3: Construcción de ARNs para la selección estructuras a base de ARNs sintético y examen del rendimiento de las mismas

5 Con el fin de insertar una secuencia, que se dirige al sitio de unión del ribosoma (SUR) del ARNm de DsdRed2, en cada uno de los tres plásmidos de pWAS construidos en el Ejemplo 1-1 y que contiene las estructuras basadas en ARNs (MicC, SgrS (referencial) y MicF (referencial)), respectivamente, se realizó la PCR usando los siguientes cebadores. El SUR de DsRed2 y la secuencia que se une al mismo se muestran en la FIG. 2.

10 En primer lugar, se realizó la mutagénesis de sitio dirigido mediante PCR usando el plásmido del Ejemplo 1-1 (que contiene la estructura basada en MicC en pWAS) y los cebadores de las SEQ ID NO: 27 y 28 para insertar una secuencia de unión complementaria de direccionamiento a DsRed2 en el frente de la estructura a base de MicC, construyendo de este modo un ARNs sintético que tiene una estructura MicC de direccionamiento de DsRed2. El productor de la PCR para la mutagénesis de sitio dirigido se purificó en gel de ADN, se trató con DpnI durante 1 hora, y después se trató con T4 polinucleótido cinasa y T4 ADN ligasa durante 4 horas, seguido por la transformación en DH5-alpha. De acuerdo con el mismo procedimiento como el descrito anteriormente, la mutagénesis de sitio dirigido se realizó usando el vector que contiene la estructura a base de SgrS pWAS (referencial) como un molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 29 y 30, construyendo de este modo un ARNs sintético que tiene una estructura a base de SgrS. Asimismo, la mutagénesis de sitio dirigido se realizó usando el vector que contiene la estructura a base de MicF pWAS (referencial) como un molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 31 y 32, construyendo de este modo un ARNs sintético que tiene una estructura a base de MicF. Cada uno de los tres ARNs sintéticos diferentes construidos tal como se describe anteriormente se transformó en *E. coli* DH5-alpha (Invitrogen, EE.UU.) transformada con el plásmido reportero, y después, las células de *E. coli* se cultivaron en un medio LB que contiene 35 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de ampicilina a 37 °C a fase estacionaria, y después se midió la fluorescencia en un sistema de citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Secuencias de los cebadores usados

25 [SEQ ID NO: 27] 5'-
GCGAGCAGTGAGAACGTCATAAGTCAACTTTCAGAATTGCGGTCATCCCA-3'

[SEQ ID NO: 28] 5'-
CATATATTTGTCCTCCTTAAATCACCCGCCAGCAGATTATACCTG-3'

[SEQ ID NO: 29] 5'-
GCGAGCAGTGAGAACGTCATGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 30] 5'-
CATATATTTGTCCTCCTTTTCAATTTCTGAATGTCTGTTTACCCCTA-3'

[SEQ ID NO: 31] 5'-
GCGAGCAGTGAGAACGTCATGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

30 [SEQ ID NO: 32] 5'-
CATATATTTGTCCTCCTTTTCAATTTCTGAATGTCTGTTTACCCC-3'

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 3, el ARNs sintético obtenido mediante la inserción de la secuencia que se dirige al SUR del ARNm de DsRed2 en el sitio de unión de Hfq de SgrS (referencial) inhibió la expresión de DsRed2 al 85 %, y el ARNs sintético obtenido mediante inserción de la secuencia que se dirige al SUR del ARNm de DsRed2 en el sitio de unión de Hfq de MicC inhibió la expresión de DsRed2 al 90 %. En otras palabras, se demostró que las tres estructuras seleccionadas ayudaron a la inhibición eficaz de la expresión y, en particular, el efecto de la estructura de ARNs que comprende el sitio de unión de Hfq de MicC (invención) fue mejor.

Ejemplo 2: Selección de la posición de ARNm eficaz para la función del ARNs sintético

Con el fin de determinar la posición de la unión al ARNm, eficaz para la función estable de los ARNs sintéticos, se construyeron los ARNr sintéticos usando el plásmido pWAS como un molde para la unión a diversos sitios de DsRed2.

Las regiones, que se introducen en cada uno de los ARNs sintéticos y emparejan sus bases con el ARNm de DsRed2, se amplificaron mediante PCR usando los siguientes cebadores del mismo modo tal como se describe en el Ejemplo 1-3 y se introdujeron en el plásmido pWAS que comprende el sitio de unión de Hfq de MicC.

En la FIG. 4, la secuencia A se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 27 y 28; la secuencia B1 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 33 y 34; la secuencia B2 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 35 y 36; la C1 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 37 y 38; la C2 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 39 y 40; la D1 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 41 y 42; la D2 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 43 y 44; la E1 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 45 y 46; la E2 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 47 y 48; la F1 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 49 y 50; la F2 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 51 y 52; la G1 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 53 y 54; y la G2 se obtuvo usando los cebadores de las SEQ ID NO: 55 y 56.

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 33] 5'-GACAAATATATGGCGAGCAGTGAGAA-3'
 [SEQ ID NO: 34] 5'-TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'
 [SEQ ID NO: 35] 5'-CACCGAGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'
 [SEQ ID NO: 36] 5'-ATGACGTTCTCACTGCTCGCCA-3'
 [SEQ ID NO: 37] 5'-GCGAGCAGTGAGAACGTCAT-3'
 [SEQ ID NO: 38] 5'-TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'

[SEQ ID NO: 39] 5'-

CACCGAGTTCATGCGCTTGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

[SEQ ID NO: 40] 5'-ATGACGTTCTCACTGCTCGCCA-3'

[SEQ ID NO: 41] 5'-

TGTTACCGGGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 42] 5'-GCTCCTCGCTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-

3'

[SEQ ID NO: 43] 5'-

CATCCTGGTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 44] 5'-GGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCTTTCT-3'

[SEQ ID NO: 45] 5'-

GGGTGGTGCCGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 46] 5'-CGGTGAACATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 47] 5'-CGAGCTGGAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 48] 5'-ACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACATTTCT-3'

[SEQ ID NO: 49] 5'-CATCCTGGTCGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

5 [SEQ ID NO: 50] 5'-GGCACCACCTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 51] 5'-GGCGACGTAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 52] 5'-GTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCTTT-3'

[SEQ ID NO: 53] 5'-ACTACAAGAAGCGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

[SEQ ID NO: 54] 5'-CGGGGATGTCGGTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'

10 [SEQ ID NO: 55] 5'-CAAGAAGCTGTCGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'
[SEQ ID NO: 56] 5'-TAGTCGGGGATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'

Cada uno de los ARNs sintéticos se transformó en una cepa de DH5-alpha transformada con el plásmido reportero construido en el Ejemplo 1-2 y se midió un descenso en la fluorescencia de DsRed2 en cada una de las cepas.

15 Como resultado, como se puede ver en la FIG. 5, cuando el ARNs estaba unido a parte o todo el SUR del ARNm de DsRed2, la expresión del ARNm de DsRed2 se inhibió al 90-99 %. Cuando el ARNs estaba unido a regiones que no fuesen el SUR, la inhibición de la expresión del ARNm de DsRed2 fue irregular (47-90 %). Tales resultados sugieren que, cuando el ARNs comprende una región que se puede unir por complementariedad con el SUR del ARNm del gen diana, es más eficaz para la inhibición de la expresión del ARNm del gen diana.

Ejemplo 3: Construcción de ARNs para otros ARNm y medición de la reactividad cruzada

20 Con el fin de examinar si el ARNs de acuerdo con la presente invención puede inhibir la expresión de ARNm de genes que no sean DsRed2, se insertó una secuencia complementaria al SUR del ARNm de cada uno de los genes LuxR, AraC y KanR en la estructura de MicC mediante mutagénesis de sitio dirigido para unirse al SUR. La secuencia complementaria al SUR de cada uno de los ARNm diana está subrayada y se indica mediante un color rojo en la FIG. 6.

25 El ARNs sintético Anti-LuxR se construyó mediante mutagénesis de sitio dirigido usando el plásmido pWAS (que contiene la estructura a base de MicC) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 57 y 58 y Anti-AraC se construyó usando los cebadores de las SEQ ID NO: 59 y 60, y Anti-KanR se construyó usando los cebadores de las SEQ ID NO: 61 y 62. Con el fin de examinar el nivel de expresión de cada uno de los genes, se construyó una proteína de fusión de cada gen con DsRed2. A tal fin, la PCR se amplificó usando el plásmido reportero del Ejemplo 1-2 que contiene la secuencia codificante de DsRed como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 64 y 26 y el producto de la PCR se escindió con las enzimas de restricción PacI/XhoI y después se introdujo en el plásmido reportero del Ejemplo 1-2.

35 El gen LuxR se amplificó por PCR usando el cromosoma ES114 de *Vibrio fischeri* (GenBank CP000020.2, CP000021.2) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 65 y 66, y el producto de PCR se trató con PacI/ClaI y después se clonó en un nuevo plásmido reportero construido en el Ejemplo 1-2, construyendo de este modo una proteína de fusión Lux-DsRed2. Los genes AraC y KanR se amplificaron por PCR usando un par de cebadores de

ES 2 709 105 T3

las SEQ ID NO: 67 y 68 y un par de cebadores de las SEQ ID NO: 69 y 70, respectivamente, y después se clonó del mismo modo que se describe anteriormente.

Secuencias de los cebadores usados

	[SEQ	ID	NO:	57]	5' -
	TTAATTAAAATCTACTCTAGAGGTGCAGGGGCAGGCGCTGGTGCGGGTGCCATGGCGAGCA				
	GTGAGAACGTCAT-3'				
5	[SEQ ID NO: 58] 5'-AATACTCCGCGGTATAAACGCAGAAAGGCCACC-3'				
	[SEQ	ID	NO:	59]	5' -
	TCATTTTGATTGCTCCTTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'				
	[SEQ	ID	NO:	60]	5' -
	CTGAAGCGCAAAATGATCGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'				
	[SEQ	ID	NO:	61]	5' -
	CCATCCGTTTTTCTCCTTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'				
	[SEQ	ID	NO:	62]	5' -
	GAACAAGATGGATTGCGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'				
	[SEQ	ID	NO:	63]	5' -
10	AATCATGTAAACGACTCCTTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGC-3'				
	[SEQ	ID	NO:	64]	5' -
	AATTATTAATTAATAATCTACATCGATGGTGCAGGGGCAGGCGCTGGTGCGGGTGCCATGGC				
	GAGCAGTGAGAACGTCAT-3'				
	[SEQ	ID	NO:	65]	5' -
	AATTATTAATTAAGGAGCAATCAAAATGAACATCAAGAACATCAACGCG-3'				
	[SEQ	ID	NO:	66]	5' -
	AATTAATCGATATTTTAAAGGTATGGACAATTAATGGCGC-3'				
	[SEQ ID NO:67] 5'-AATTATTAATTAAGGAGAGAAAAACGGATGGCTG-3'				
15	[SEQ ID NO:68] 5'-AATTAATCGATTGACAACCTTGACGGCTACATCATTCA-				
	3'				

[SEQ

ID

NO: 69]

5' -

AATTATTAATTAAGGAGTCGTTTACATGATTGAACAAGATGGATTGCACG-3'

[SEQ ID NO: 70] 5'-AATTAATCGATGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATA-3'

A continuación, tal como se muestra en la FIG. 7A, cada uno de los plásmidos construidos que contienen los tres ARNs sintéticos y los tres genes diana, respectivamente, se transformó en una cepa de DH5-alpha y después, la fluorescencia relativa de DsRed2 en la cepa, y los resultados de la medición se muestran en la FIG. 7B.

- 5 Como resultado, se pudo ver que el ARNs sintético construido mediante el procedimiento de la presente invención mostró un efecto inhibidor de la expresión del 80-86 % frente al gen diana. Además, el nivel de expresión de los genes no dirigidos fue similar al de en el caso en el que no contuviese ARNs.

- 10 Tales resultados indican que el ARNs sintético de acuerdo con el procedimiento de la preparación de la presente invención puede inhibir de manera eficaz solo la expresión de ARNm del gen diana. Además, como se muestra en la FIG. 8, cuando la energía de unión al ARNm diana es de -53 kcal/mol o menos y cuando la energía de unión a otros ARNm es de -13 kcal/mol o mayor, no tendrá lugar reactividad cruzada.

Ejemplo 4: Producción de microorganismos recombinantes productores de tirosina usando ARNs sintético

- 15 Con el fin de construir un microorganismo recombinante para producir el compuesto aromático tirosina, se realizó un experimento para seleccionar una cepa que tiene la mayor capacidad para producir tirosina y una combinación de genes inhibidos en la cepa: (1) construyendo un plásmido que sobreexpresa las enzimas implicadas en la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, en particular, tirosina, para mejorar los flujos metabólicos hacia los compuestos; (2) construyendo ARNs sintéticos con el fin de inhibir la expresión de genes que codifican las enzimas y las proteínas que pueden ir a vías opuestas a la vía de biosíntesis de tirosina, con el fin de dirigir los flujos metabólicos intracelulares hacia la vía de biosíntesis de la tirosina; y (3) transformando el plásmido en 14 cepas diferentes de *E. coli*, y después transformando adicionalmente diversas combinaciones de ARNs sintéticos en las cepas.

4-1: Construcción del plásmido básico para mejorar la actividad de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos

- 25 En primer lugar, se construyó un plásmido que sobreexpresa enzimas requeridas para mejorar la actividad de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos.

Los genes diana usados en este Ejemplo fueron ppsA, que codifica la policétido sintasa A de tipo I de síntesis de fenolticsterol, tktA que codifica la transcetolasa, aroG y aroF que codifican la 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa, aroK que codifica la shikimato cinasa I, y tyrA que codifica la corismato mutasa, y C que codifica la prefenato deshidrogenasa derivada de *Zymomonas mobilis* (FIG. 9).

- 30 En primer lugar, como se muestra en la FIG. 10, se construyó un plásmido pTyr-b que no contiene ARNs sintético. De manera específica, se usó un plásmido pTac15k (Hiszczyńska-Sawicka y col., Plasmid 38:174, 1997) como un plásmido básico, y se amplificó el gen aroF mediante PCR usando el cromosoma W3110 de *E. coli* (GenBank AP009048) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 71 y 72, y después se clonó en el plásmido pTac15k usando EcoRI/SacI. A continuación, se amplificó el gen tktA mediante PCR usando el cromosoma W3110 de *E. coli* como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 73 y 74, y después se clonó en el plásmido usando XbaI/SphI. A continuación, se amplificó el gen ppsA mediante PCR usando el cromosoma W3110 de *E. coli* como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 75 y 76 y después se escindió con SacI/Spel, después de lo cual, el gen escindido se unió al vector del plásmido escindido con SacI/XbaI. De esta forma, se construyó un plásmido pTyr-b que no contiene ARNs sintético.

- 40 Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 71] 5'-AATTATGAATTCATGCAAAAAGACGCGCTGAATAAC-

3'

[SEQ ID NO: 72] 5'-TAATTGAGCTCTTAAGCCACGCGAGCCGTCA-3'

[SEQ ID NO: 73] 5' -

ATCATATCTAGAAGGAGGTTATTCATGTCCTCACGTAAAGA-3'

[SEQ ID NO: 74] 5'-TTCGTTGCATGCTTACAGCAGTTCTTTTG-3'

[SEQ ID NO: 75] 5' -

AATTAAGAGCTCTTAATTAACGGTTAAATATGCAAAGATAAATGCG-3'

[SEQ ID NO: 76] 5'-AATTAACTAGATTATTTCTTCAGTTCAGCCAGG-3'

- 5 A continuación, los genes restantes que están implicados en la biosíntesis de tirosina se clonaron construyendo un plásmido pTyr-a (FIG. 10). Estos genes se iban a expresar mediante un promotor BBa_JJ23113 registrado en el Registro MIT (<http://partsregistry.org>). De manera específica, el promotor de interés se construyó por PCR usando los cebadores de la SEQ ID NO: 77 y 78 sin molde. El promotor construido se clonó usando un kit de clonación TOPO y se secuenció para confirmar el error, tras lo cual se escindió con SacI/NotI y después se unió al plásmido pWA del Ejemplo 1. La secuencia de terminación de la transcripción T1/TE se amplificó mediante PCR usando el plásmido pWAS del Ejemplo 1 como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 79 y 80, y después se unió aguas abajo del promotor. De esta forma, se construyó un plásmido pWA-J23113-T1/TE y, después, se clonaron los genes restantes en este plásmido. Después, la región que va desde el promotor hasta T1/TE se amplificó mediante PCR y se clonó en un plásmido pWA, construyendo de este modo un plásmido pTyr-a tal como se muestra en la FIG. 10.

15 Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 77] 5' -

GAGCTCCTGATGGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTATGCTAGCCATATCGAAAGGATAGTCTT

GATAACCATAAGTTTAATTAAGCGGCCGC-3'

[SEQ ID NO: 78] 5' -

GCGGCCGCTTAATTAACTTATGGTTATCAAGACTATCCTTTTCGATATGGCTAGCATAATC

CCTAGGACTGAGCTAGCCATCAGGAGCTC-3'

[SEQ ID NO: 79] 5' -

ATAATTGAATTCCCAGGCATCAAATAAACGAAAGGC-3'

[SEQ ID NO: 80] 5' -

CGAATTGGGTACCTATAAACGCAGAAAGGCCACCCG-3'

- 20 De manera específica, se amplificó el gen *tyrA* mediante PCR usando el cromosoma W3110 de *E. coli* como molde con los cebadores de las SEQ ID NO: 81 y 82 y se escindió con PacI/EcoRI y se clonó en el plásmido pWA-J23113-T1/TE, construyendo de este modo un gen que consiste en la secuencia codificante del promotor-secuencia de terminación de la transcripción. El gen *tyrA* es sensible a la inhibición de retroalimentación por tirosina, y por este motivo, con el fin de eliminar la inhibición de la retroalimentación, se eliminaron dos restos de aminoácidos de *tyrA* mediante mutagénesis de sitio dirigido con A354V/M53I. En el presente documento, Se intentó la mutación A354V usando cebadores de las SEQ ID NO: 83 y 84, y el plásmido resultante se sometió a la mutación M53I usando cebadores de las SEQ ID NO: 85 y 86, eliminando de este modo la inhibición de retroalimentación (Lutke-Eversloh y col., Applied Microbiology and Biotechnology, 75:103, 1999).

[SEQ ID NO: 81] 5'-AATCATTTAATTAACGGCTCGCGTGGCTTAAG-3'
 [SEQ ID NO: 82] 5'-AATTAAGAATTCTTACTGGCGATTGTCATTCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 83] 5'-TTTGGCCTCGCGTCGTGCA-3'
 [SEQ ID NO: 84] 5'-ATAGATGCCTCGCGCTCCG-3'
 [SEQ ID NO: 85] 5'-TGCAGCGTTTTTCAGAGTGAAAGCC-3'
 [SEQ ID NO: 86] 5'-CGTAATCGCCGAACCAAGTGCTC-3'

Del mismo modo que el descrito anteriormente, se clonaron aroG, aroK y tyrC. De manera específica, se amplificó aroG mediante PCR usando el cromosoma W3110 de *E. coli* como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 87 y 88, y se amplificó aroK mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 89 y 90, y tyrC se amplificó por PCR usando el cromosoma de *Zymomonas mobilis* (cepa ZM6, ATCC29191) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 91 y 92. Los productos de la PCR se escindieron con PacI/EcoRI y después se clonaron en pWA-J23113-T1/TE. Entre estos genes, aroG también es sensible a la inhibición por retroalimentación, y por lo tanto, se sometió a la mutación de aminoácidos A146N. Esta mutación se realizó mediante mutagénesis de sitio dirigido usando los cebadores de las SEQ ID NO: 93 y 94, de manera similar al caso de tyrA (Lutke-Eversloh y col., Applied Microbiology and Biotechnology, 75:103, 1999).

[SEQ ID NO: 87] 5'-

TTAATTAAAGGAGAAAAAATGAATTATCAGAACGACGATTTAC-3'

[SEQ ID NO: 88] 5'-GAATTCTTACCCGCGACGCGCTTTT-3'
 [SEQ ID NO: 89] 5'-AATTAATTAATTAAGACTCTCGCAATATCTTATG-3'
 [SEQ ID NO: 90] 5'-AATTAAGAATTCTTAGTTGCTTTCCAGCATGTG-3'

[SEQ ID NO: 91] 5'-

TTAATTAAAGGAGAAAAAATGACCGTCTTTAAGCATATTGCCA-3'

[SEQ ID NO: 92] 5'-GAATTCTTAAGGGTGAATATCGTGGTCTGTTTTT-3'
 [SEQ ID NO: 93] 5'-AATATGATCACCCCAATATCTCG-3'
 [SEQ ID NO: 94] 5'-GAGAACTCACCTGCCGCT-3'

El pWA-J23113-tyrA (A354V/M53I) (o aroG (A146N), aroK, tyrC)-T1/TE construido tal y como se describe anteriormente se sometió a PCR con cebadores de las SEQ ID NO: 95 y 96 para amplificar la región total que va desde el promotor hasta T1/TE y el producto de la PCR se escindió con SpeI/SacI y se clonó en pWA escindido con XbaI/SacI. XbaI y SpeI se caracterizan por que se pueden unir de manera complementaria entre sí, pero desaparecen una vez que se unen, ya que la secuencia de la región escindida es diferente. Dado que el cebador de la SEQ ID NO: 96 incluye XbaI y SacI, el gen amplificado por PCR se puede clonar de manera infinita usando SpeI/SacI, y el vector se puede clonar de forma infinita usando XbaI/SacI.

[SEQ ID NO: 95] 5'-AATTAACTA GTCTGATGGC TAGCTCAGT-3'

[SEQ ID NO: 96] 5'-ATTAATGAGC TCATAATTTC TAGATATAAA

CGCAGAAAGG CC-3'

De esta forma, tyrA(A354/M53I), aroG(A146N), tyrC y aroK se clonaron secuencialmente en pWA.

4-2: Examen de la productividad de tirosina de 14 cepas diferentes de *E. coli* usando plásmidos

Los dos plásmidos construidos tal como se describen anteriormente se transformaron en las siguientes 14 cepas diferentes de *E. coli* que no contienen ARNs sintético: cepas K-12 (C600 (ATCC 23738), DH5α (Invitrogen), ER2925 (New England Labs), JM110 (Agilent Technologies), MG1655 (Invitrogen), S17-1 (ATCC 47055), T1R(One shot(R) ccdB SurvivalTM2 T1R, Invitrogen), TG1 (ZymoResearch), TOP10 (Invitrogen), W3110 (ATCC 39936), XL1-Blue (Agilent Technologies)), cepa B (BL21(DE3, Promega), cepa W (ATCC 9637), y un híbrido de las cepas K-12 y B (HB101, Promega).

Los microorganismos recombinantes resultantes se cultivaron en un medio de LB que contiene 50/ml de ampicilina y 50/ml de kanamicina a la fase estacionaria, y después se transfirieron a una relación de volumen de 1/100 a un matraz que contiene 50 ml del medio. Después, las células microbianas se cultivaron a 37 °C hasta 48, y se midió la concentración máxima de tirosina durante el cultivo.

Tabla 1

Compuesto	Concentración
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g/l
KH ₂ PO ₄	6,75 g/l
Acido cítrico	0,85 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
Acido succínico	0,1 g/l
Glucosa	20 g/l
Solución de elemento traza	5 ml/l (Tabla 2)

Tabla 2

Compuesto	Concentración
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 g/l
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,58 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 g/l
(NH ₄) ₆ Mo7O ₂₄ ·4H ₂ O	0,1 g/l
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,02
HCl al 35 %	10 ml

Se tomó una muestra del matraz a intervalos de 6-horas, se ajustó a un pH de 1 mediante la adición de HCl a la misma y después se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, la muestra se centrifugó durante 5 minutos, y se midió la concentración de tirosina en el sobrenadante mediante HPLC (Agilent Technologies). La columna usada fue una columna Zorbax SB-Aq (3 x 250 mm; Agilent Technologies).

"Sin ARNs" indicado en la primera columna de la FIG. 11 indica la producción de tirosina en las cepas de *E. coli* que tienen solo los dos plásmidos construidos tal como se describe anteriormente. Las 14 cepas diferentes de *E. coli* produjeron diversas concentraciones (0-1,0 h/l) de tirosina. Esto sugiere que las diferentes cepas de *E. coli* tienen diferentes capacidades metabólicas y que, con el fin de maximizar la producción de metabolitos, es importante seleccionar una cepa adecuada además de descubrir un gen adecuado cuyo flujo en las redes metabólicas hay que regular. En este Experimento, la cepa S17-1 mostró la producción más alta de tirosina.

4-3: Construcción de ARNs sintético para la identificación del gen que contribuye al aumento en la producción de tirosina y construcción del plásmido final pTyr-a/pTyr-b

En los Ejemplos anteriores, se demostró que la actividad de la vía de biosíntesis de tirosina básica es suficiente para producir tirosina. En este Ejemplo, se realizó un experimento para identificar el gen, que se va a silenciar con el fin de aumentar adicionalmente la productividad, mediante ARNs sintéticos. De manera específica, con el fin de silenciar el gen *tyrR* que inhibe la expresión de enzimas implicadas en la vía de biosíntesis de tirosina y para dirigir más flujo hacia la vía de biosíntesis de tirosina, se silenciaron *csrA* y *pgi*, y *ppc* que codifica la enzima para convertir a fosfoenolpiruvato y aumentar la cantidad de fosfoenolpiruvato se silenció para aumentar la cantidad de fosfoenolpiruvato.

Se construyó anti-*tyrR* mediante mutagénesis de sitio dirigido usando el plásmido pWAS construido anteriormente como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 97 y 98. Del mismo modo, se construyó anti-*ppc* usando los cebadores de la SEQ ID NO: 99 y 100, y se construyó anti-*csrA* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 101 y 102 y se construyó anti-*pgi* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 103 y 104.

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 97] 5'-AGTCTTTTGTGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 98] 5'-TCCAGACGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATT-3'
 [SEQ ID NO: 99] 5'-TATTCCGCATTG GCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 100] 5'-TTGTTTCGTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'
 [SEQ ID NO: 101] 5'-ACTCGTCGAGTT GCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 102] 5'-CAGAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'
 [SEQ ID NO: 103] 5'-AAT CCAACGCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 104] 5'-GAT GTTTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'

El sistema pBAD, cl(ts) introducido en el pWAS con el fin de aumentar el efecto regulador de la expresión del ARNs sintético se introdujo en un pTyr-a que no contiene ARNs. De manera específica, la PCR se realizó usando pWAS como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 105 y 96, y el producto de la PCR se escindió con SpeI/SacI y se unió con el vector construido escindido con XbaI/SacI.

A continuación, del mismo modo que anteriormente, se amplificaron anti-csrA, anti-pgi o anti-ppc usando los cebadores de las SEQ ID NO: 104 y 94, el producto de la PCR (ARNs) se escindió con SpeI/SacI y se unió con el vector construido escindido con XbaI/SacI. De esta forma, se construyeron tres plásmidos pTyr-a que tienen diferentes ARNs (FIG. 10). Sin embargo, el gen *tpl* mostrado en la FIG. 10 se usó para la producción de fenol, y por lo tanto, no se clonó en esta etapa. El gen *tpl* se describirá en detalle en el Ejemplo relacionado con la producción de fenol.

Se clonó anti-tyrR en pTyr-b. De manera específica, se amplificó anti-tyrR mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 106 y 107 y después se escindió con SpeI/NheI. Asimismo, el vector pTyr-b construido que no contiene ARNs se escindió con NheI, y después se unió con el anti-tyrR, construyendo de este modo un vector pTyr-b que contiene el ARNs.

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 105] 5'-TAATTTACTA GTATGGCTGA AGCGCAAAT GATCC-3'
 [SEQ ID NO: 106] 5'-AATTAACTA GTTAACACCG TGCGTGTGA-3'
 [SEQ ID NO: 107] 5'-AATTAAGCTA GCTATAACG CAGAAAGGCC CA-3'

4-4: Experimento en la producción de tirosina en 14 cepas recombinantes de E. coli diferentes con ARNs sintético

Un total de cuatro combinaciones, incluyendo una combinación del pTyr-b construido que contiene anti-tyrR y pTyr-b que no contiene ARNs, y una combinación del pTyr que contiene anti-tyrR y pTyr-b que contiene cada uno de los ARNs, se transformaron en 14 cepas diferentes de *E. coli*. Las cepas se cultivaron del mismo modo que el procedimiento de cultivo en matraz descrito anteriormente, y se midió la concentración de tirosina más alta en 48 horas después del comienzo del cultivo.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 11, la mejor combinación fue el caso en el que los genes *tyrR* y *csrA* en la cepa S17-1 se silenciaron. Esta combinación mostró tirosina en una concentración de 2,0 g/l en el matraz.

Entre las combinaciones, la combinación de anti-tyrR+anti-ppc y la combinación de anti-tyrR-anti-pgi mostró un descenso en la producción de tirosina. Particularmente, como se puede ver en la FIG. 12, se inhibió el crecimiento de las células hospedadoras introducidas con anti-pgi, y por lo tanto, la producción global de tirosina se redujo.

4-5: Restauración del crecimiento celular y aumento en la producción de tirosina mediante la regulación de la expresión usando ARNs sintético

Tal como se describe en el Ejemplo 4-4, cuando se inhibía la expresión de *pgi*, se inhibió el crecimiento de células, dando como resultado un descenso en la producción global de tirosina. Esto sugiere que, cuando el crecimiento de las células se restaura de algún modo incluso aunque se pierde el flujo metabólico que entra en la vía de biosíntesis de tirosina, la producción global de tirosina puede aumentar. Basándose en esta propuesta, se reguló la expresión del gen *pgi*. Esta regulación se realizó mediante la delección de parte de (uno o dos) nucleótidos de la secuencia de unión a *pgi* y de la secuencia de anti-*pgi* para reducir la energía de unión. De manera específica, el uso de pWAS clonado con anti-*pgi* como un molde, se construyó anti-*pgi*-DI que comprende una delección de un nucleótido mediante mutagénesis de sitio dirigido usando cebadores de las SEQ ID NO: 108 y 104, y anti-*pgi*-D2 que comprende una delección de dos nucleótidos mediante mutagénesis de sitio dirigido usando cebadores de las SEQ ID NO: 109 y 104 (FIG. 13).

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 108] 5'-ATCCAACGCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 109] 5'-TCCAACGCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'

Cada uno de los genes construidos se clonó en el plásmido pTyr-a del mismo modo que se describe en el Ejemplo 4-3, y cada uno de los plásmidos se clonó en 14 cepas de *E. coli* diferentes. Después, se examinó la producción de tirosina en cada una de las cepas.

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 11, cuando uno o más nucleótidos de la secuencia de unión del

ARNs sintético se delecionaron para reducir la energía de unión, aumentó la producción de tirosina en todas las cepas recombinantes de *E. coli*. Particularmente, como se puede ver en la FIG. 11, cuando la tasa de crecimiento de la cepa TOP10 que tiene la capacidad más baja para producir tirosina se comparó con la de la cepa S17-1 que tiene la capacidad más alta para producir tirosina, se puede ver que, cuando se redujo la energía de unión del ARNs, la tasa de crecimiento de los microorganismos hospedadores se restauró gradualmente.

A lo largo de este Ejemplo, se puede ver que el ARNs sintético de acuerdo con la presente invención se puede usar para inhibir la expresión del gen diana y se puede regular su capacidad para inhibir la expresión del gen diana, lo que sugiere que el gen del ARNs se puede usar para regular la expresión de diversos genes diana.

4-6: Comparación de la inhibición de la expresión del gen diana mediante ARNs sintético entre cepas

A partir de los resultados de los Ejemplos anteriores, se puede ver que la producción de tirosina difiere entre las cepas, lo que sugiere que es importante seleccionar la cepa más adecuada. Además, se puede ver que el procedimiento de delección génica convencional es lento, mientras que el ARNs sintético de acuerdo con la presente invención se puede construir fácilmente y se puede aplicar rápidamente a diversas cepas, lo que sugiere que el ARNs sintético es muy adecuado para la medición de las capacidades metabólicas de las cepas y la selección de la cepa más adecuada. Sin embargo, aunque los ARNs evolutivamente están altamente conservados en células procariotas conocidas y, por lo tanto, la posibilidad de diferencia en el efecto inhibitor del gen diana del ARNs sintético entre cepas es baja. Con el fin de verificar este hecho, se llevó a cabo el siguiente experimento.

En este Ejemplo, se construyeron genes del mismo modo que se describe en el Ejemplo 3. En el Ejemplo 3, se fusionó DsRed2 con cada uno de los genes luxR, araC y kanR, pero en este Ejemplo, se fusionó DsRed2 con cada uno de los genes pgi, csrA, tyrR y ppc, y se midió el grado de expresión de cada gen mediante fluorescencia. En el presente documento, se realizó la comparación de la expresión génica entre la cepa S17-1 que tiene la productividad más alta de tirosina y la cepa TOP10 que tiene la productividad más baja de tirosina. Si no hay diferencia en la expresión génica entre la cepa S17-1 y la cepa TOP10, no habrá diferencia en la expresión génica entre las otras cepas.

Para la clonación de pgi, pgi se amplificó mediante PCR usando el cromosoma de S17-1 como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 110 y 111, y el producto de la PCR se escindió con PaeI/XhoI, y después se clonó en el plásmido reportero de DsRed2 del Ejemplo 3. Del mismo modo, se amplificó tyrR mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 112 y 113, se amplificó csrA mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 114 y 115, se amplificó ppc mediante PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 116 y 117 y se clonaron los productos de PCR. Cuando se iba a medir la inhibición de la expresión del gen de interés en la cepa S17-1, se realizó la clonación en el cromosoma de S17-1, y cuando se iba a medir en la cepa TOP10, se realizó la clonación en el cromosoma de TOP10.

Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 110] 5'-AATTATTAATTAACAATTCTCAAAATCAGAAG

AGTATTGCTA-3'

[SEQ ID NO: 111] 5'-AATTACTCGAGCAGCATCTGATCGTCAAGG -3'

[SEQ ID NO: 112] 5'-AATTATTAATTAATAATTGTTCTTTTTTCAGGT

GAAGGTTCCC -3'

[SEQ ID NO: 113] 5'-AATTACTCGAGACCGCGTAAATCAATGCCTC TTA-

3'

[SEQ ID NO: 114] 5'-AATTATTAATTAACCTTTTAATCTTTCAA

GGAGCAAAGA -3'

[SEQ ID NO: 115] 5'-AATTACTCGAGACGCTGGTAGATCTCTTCAC G-

3' \

[SEQ ID NO: 116] 5'-

AATTATTAATTAAATAAGATGGGGTGTCTGGGGTAAT -3'

[SEQ ID NO: 117] 5'-AATTACTCGAGATCATTGCCAGCGCGTGAAG-3'

- 5 Como resultado, como se puede ver en la FIG. 14, el anti-tyrR mostró tasas de inhibición del 85,6±9,4 % y el 80,0±9,1 % en S17-1 y TOP10, respectivamente, y el anti-csrA mostró tasas de inhibición del 84,9±9,8 % y el 87,8±6,7 %. Los ARNs restantes mostraron tasas de inhibición similares a las mostradas por estos ARNs. Esto sugiere que los ARNs sintéticos muestran tasas de inhibición similares entre cepas y presentan el mismo efecto en diversas cepas.

4-7: Fermentación de la cepa S17-1 transformada con el plásmido pTyr-a(anti-csrA)/pTyr-b(anti-tyrR)

- 10 La cepa S17-1 seleccionada finalmente se transformó con cada uno de los plásmidos pTyr-a(anti-csrA) y pTyr-b(anti-tyrR), y los microorganismos recombinantes se sometieron a fermentación de lote alimentado.

- 15 De manera específica, se cultivaron 200 ml de los microorganismos recombinantes en un medio LB que contiene arabinosa al 1 %, 25 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina a 37 °C, y el cultivo se realizó en un fermentador de 2 litros (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ). En el presente documento, la DO inicial fue 0,5. La solución de alimentación estaba compuesta de 600 g/l de glucosa, 7,5 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2 g/l de KH₂PO₄ y 5 g/l de extracto de levadura, y cuando el medio en el fermentador cambió de 0,01 a 6,8, se ajustó el pH mediante la adición de NH₄OH al 25 % (v/v). Asimismo, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo a un nivel constante del 40 % suministrando 1 vvm (volumen de aire/volumen de funcionamiento/min), y la velocidad de agitación se controló de forma automática hasta una rpm de hasta 1000.

- 20 El cultivo se realizó durante un total de 110 horas. La DO de las células y la producción de tirosina se muestran en la FIG. 15. Tal como se puede ver en la Figura 15, se produjo tirosina a una concentración de hasta 21,9 g/l.

4-8: Producción de fenol en diversas cepas de E. coli

- 25 Se realizó un experimento en la conversión de tirosina producida a fenol. De manera específica, para la expresión del gen *tpl* que convierte tirosina a fenol, se sintetizó un promotor *placIQ* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 118 y 119 sin molde, y el promotor sintetizado se escindió con *SacI*/*PacI* y después se clonó en pWA-J23113-T1/TE para sustituir al promotor. Asimismo, se amplificó el gen *tyrA* mediante PCR a partir del cromosoma de *Pasteurella multocida* (GenBank, 002663.1) usando los cebadores de las SEQ ID NO: 120 y 121, y después se clonó en pWA-*placIQ*-T1/TE usando *PacI*/*EcoRI*. El gen construido tal como se describe anteriormente se amplificó por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 122 y 96, y se escindió con *SpeI*/*SacI*, y después se unió al plásmido pTyr-a (anti-csrA) escindiendo con *XbaI*/*SacI*, construyendo de este modo un plásmido pTyr-a (anti-csrA)-TPL.

[SEQ ID NO: 118] 5'-

GAGCTCTTGGTGCAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCAAGCACATATCGAAAGG

ATAGTCTTGATAACCATAAGTTTAATTAA-3'

[SEQ ID NO: 119] 5'-

TTAATTAAACTTATGGTTATCAAGACTATCCTTTTCGATATGTGCTTGGCGCTATCATGCCA

TACCGCGAAAGGTTTTGCACCAGAGCTC-3'

[SEQ ID NO: 120] 5'-

TTAATTAAAGGAGAAAGATTATGAGAACTATCCTGCAGAACCTTATA-3'

[SEQ ID NO: 121] 5'-

GAATTCTTAATGGTGATGATGGTGATGCGCTTACGCTTTCGGTTCAAAACGCG-3'

[SEQ ID NO: 122] 5'-CATTAAGTAGTTGGTGCAAAACCTTTCGCG-3'

5 El plásmido construido junto con el plásmido pTyr-b (anti-tyrR) se transformó en las 14 cepas diferentes de *E. coli* probadas en el Ejemplo 4-2 y después se realizó el cultivo en matraces de cada cepa recombinante del mismo modo que el procedimiento de cultivo de tirosina descrito anteriormente, y se midió la producción de fenol más alta durante las 48 horas de cultivo.

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 16, la cepa W3110 presentó la producción más alta de fenol (357,6 mg/l) y la cepa S17-1 que presentó la productividad de tirosina más alta en el ejemplo anterior presentó una producción de fenol de 68,8 mg/l.

10 **Ejemplo 5: Producción de microorganismos recombinantes productores de cadaverina usando ARNs sintético**

En este Ejemplo, se mejoró el flujo metabólico de la vía de biosíntesis de lisina, y después, se realizó la selección del gen a silenciar con el fin de aumentar adicionalmente la producción de cadaverina en un microorganismo recombinante que convierte lisina a cadaverina usando lisina descarboxilasa (CadA).

15 La FIG. 16 muestra vías de biosíntesis de cadaverina a partir de glucosa. Estas vías de biosíntesis incluyen vías de consumo para la producción de otros metabolitos. Para aumentar la producción de cadaverina, se prefirió bloquear las redes que consumen metabolitos.

20 En este Ejemplo, se seleccionaron 8 genes candidatos capaces de suprimir estas redes, y se construyeron ARNs sintéticos capaces de inhibir la expresión de estos genes. Los genes candidatos seleccionados fueron los siguientes: *gltA* (citrato sintasa), *thrA* (aspartato cinasa I), *thrB* (homoserina cinasa), *thrC* (treonina sintasa), *thrL* (péptido líder de operón *thr*), *metB* (cistationina gamma sintasa), *murE* (UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato-L-lisina ligasa), y *murF* (UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamil-2,6-diaminopimelato-D-alanil-D-alanino ligasa).

25 De manera específica, se construyó anti-*glt* (ARNs sintético) mediante mutagénesis de sitio dirigido usando pWAS (construido en el Ejemplo 1) como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 123 y 124. Del mismo modo, se construyó anti-*metB* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 125 y 126; se construyó anti-*murE* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 127 y 128; se construyó anti-*murF* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 129 y 130; se construyó anti-*thrA* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 131 y 132; se construyó anti-*thrB* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 133 y 134; se construyó anti-*thrC* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 135 y 136; y se construyó anti-*thrL* usando los cebadores de las SEQ ID NO: 137 y 138.

30 Secuencias de los cebadores usados

[SEQ ID NO: 123] 5'-AAAGCAAACTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 124] 5'-TGTATCAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

[SEQ ID NO: 125] 5'-ACAGGCCACCATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 126] 5'-TTACGCGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

35 [SEQ ID NO: 127] 5'-AATTTGCGCGACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 128] 5'-ACGATCTGCCACTTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

[SEQ ID NO: 129] 5'-AACCCCTTAGCCAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 130] 5'-ACGCTAATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 131] 5'-AAGTTCGGCGGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 132] 5'-CAACACTCGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

40

[SEQ ID NO: 133] 5'-TATGCCCCGGCTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 134] 5'-AACTTTAACCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

[SEQ ID NO: 135] 5'-AATCTGAAAGATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 136] 5'-GTAGAGTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

5 [SEQ ID NO: 137] 5'-AGCACCACCATTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 138] 5'-AATGCGTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

Los genes contruidos mediante mutagénesis de sitio dirigido usando las secuencias de los cebadores se transformaron en células DH5a (Invitrogen) del siguiente modo. Se realizó el cultivo usando un medio de placa que contiene LB-agar, arabinosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina a 25 °C durante 2 días, y las colonias resultantes se cultivaron en medio LB líquido que contiene agarosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina. Después, se purificaron los plásmidos de las células y se secuenciaron, y se usó un plásmido correcto en un experimento posterior. Este cultivo en presencia de arabinosa al 1 % y a 25 °C inhibe de forma eficaz la expresión del ARNs sintético, y por lo tanto es un procedimiento esencial. Además, si el gen cromosómico que está dirigido por el ARNs sintético tiene una influencia muy significativa sobre el crecimiento de las células hospedadoras, el crecimiento de las células será insuficiente cuando no se inhiba la expresión del ARNs sintético. Esta influencia del ARNs sintético puede provocar dificultades en experimentos posteriores, y por lo tanto, se evita. Sin embargo, si el ARNs sintético no tiene influencia sobre el crecimiento celular, el cultivo se puede realizar en ausencia de arabinosa o a 37 °C. Cuando se realiza el cultivo para la producción de un producto metabólico deseado, el ARNs sintético se debería de expresar lo suficiente, y por lo tanto, en este caso, el cultivo se realizó en ausencia de arabinosa y a 37 °C.

Cada uno de los ARNs sintéticos contruidos tal como se describe anteriormente se transformó en el microorganismo recombinante XQ56 (que contiene un plásmido p15CadA) que produce cadaverina con alta eficacia. La cepa XQ56 usada en este Ejemplo se construyó mediante el procedimiento de Qian (Qian, Biotechnology and Bioengineering, 108(1):93-103, 2011). En resumen, con el fin de producir cadaverina, los genes *speE*, *speG*, *puuA* e *ygiG* que son enzimas de degradación de cadaverina se deleccionaron de *E. coli*, y con el fin de aumentar la producción de los metabolitos precursores de cadaverina, también se deleccionó *iclR*. Además, con el fin de eliminar la inhibición de la retroalimentación por lisina que es un precursor inmediato de cadaverina, se modificó el cromosoma de manera que los promotores de los genes *dapA*, *dapB* y *lysA* se expresaron de manera constitutiva sin que estén inhibidos por lisina. Finalmente, con el fin de producir suficiente cadaverina, se sobreexpresó el gen *cadA* que produce cadaverina a partir de lisina en la forma de un plásmido (p15CadA). De esta forma, se construyó la cepa XQ56 usada en la presente invención.

Tras la transformación, las colonias resultantes se transfirieron a medio LB líquido (arabinosa al 1 %, 25 µg/ml de ampicilina, y 25 µg/ml de kanamicina) y se cultivaron a 25 °C hasta la fase estacionaria. Después, las células se transfirieron a una proporción de volumen de 1/100 a un matraz que contiene 50 ml de medio (véase la Tabla 3 a continuación) y después se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. Después, se muestreó el sobrenadante del cultivo, y se midió la concentración de cadaverina por análisis de HPLC. De manera específica, se permitió que la muestra reaccionase con o-ftaldialdehído, y después se analizó mediante HPLC de fase inversa (Qian, Biotechnology and Bioengineering, 108(1):93-103, 2011).

Tabla 3

Compuesto	Concentración
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g/l
KH ₂ PO ₄	6,75 g/l
Acido cítrico	0,85 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g/l

(continuación)

Compuesto	Concentración
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g/l
Glucosa	20 g/l
Solución de elemento traza	5 ml/l (Tabla 4)

Tabla 4

Compuesto	Concentración
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2 g/l
KH_2PO_4	6,75 g/l
Ácido cítrico	0,85 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g/l
Glucosa	20 g/l
Solución de elemento traza	5 ml/l (Tabla 4)

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 19, la producción de cadaverina en la cepa básica (XQ56 que contiene un plásmido p15CadA) fue de $1,4 \pm 0,05$ g/l, y cuando se tomó como el 100 %, las cepas en las que las expresiones de cada uno de murE, metB y thrL entre los ocho genes candidatos estaban inhibidos mostraron aumentos en la producción de cadaverina del 55 % (2,15 g/l) para murE, el 24 % (1,73 g/l) para metB y el 34 % (1,87 g/l) para thrL. Tales resultados experimentales sugieren que el ARNs sintético de acuerdo con la presente invención se puede usar para regular la expresión de ARNm de diversos genes diana.

Ejemplo 6: Regulación de la eficacia inhibidora de los ARNs sintéticos y mediciones del cambio en el crecimiento celular con cambio en el número de ARNs sintéticos introducidos

6-1: Regulación de la eficacia inhibidora de los ARNs sintéticos del Ejemplo 3

Con el fin de verificar que la eficacia inhibidora del ARNs sintético se puede controlar mediante la regulación de la energía de unión entre el ARNs sintético y el ARNm diana, se construyeron ARNs sintético anti-DsRed2 y ARNs anti-LacZ con diversas energías de unión usando, como molde, un plásmido que contiene la estructura MicC y el promotor PR para la expresión del mismo en el plásmido pWAS.

En el caso del ARNs anti-DsRed2, las secuencias del sitio de unión se produjeron aleatoriamente tal como se describe a continuación con el fin de producir un intervalo de energía amplio, y en el caso del ARN anti-lacZ, cada secuencia de unión que se corresponde con el intervalo de energía se diseñó tal como se describe a continuación usando el programa UNAFold. Cuando se usó DsRed2, se produjeron ARNs anti-DsRed2 mediante la mutagénesis de sitio dirigido descrita anteriormente usando los cebadores de las SEQ ID NO: 169 y 170 y cuando se usó LacZ, se produjeron diversos ARNs anti-LacZ mediante mutagénesis de sitio dirigido usando cebadores directos/inversos tales como los cebadores de las SEQ ID NO: 171/172, 173/174, ... 195/196.

Cebadores para las variantes de anti-dsRed2

[SEQ ID NO: 169] 5' -NNNNNNNNNNNNNNNNNN

GCAACCATTATCACCGCCA-3'

[SEQ ID NO: 170] 5' -NNNNNNNNNNNNNNNNNN

TTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

ES 2 709 105 T3

(N es cualquier nucleótido).

Cebadores para las variantes de anti-LacZ

[SEQ ID NO: 171] 5'-ATGATGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 172] 5'-GGTCAT TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 173] 5'-ATGATTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-

3'

5

[SEQ ID NO: 174] 5'-GGTCAT TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 175] 5'-TGATTAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-

3'

[SEQ ID NO: 176] 5'-TGGTCAT TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-

3'

[SEQ ID NO: 177] 5'-TGATTACGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-

3'

[SEQ ID NO: 178] 5'-TGGTCAT TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-

3'

10

[SEQ ID NO: 179] 5'-GATTACGGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-

3'

[SEQ ID NO: 180] 5'-ATGGTCAT TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-

3'

[SEQ ID NO: 181] 5'-

GATTACGGGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 182] 5'-ATGGTCAT TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-

3'

[SEQ ID NO: 183] 5'-

ATTACGGAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

15

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 184] 5'-CATGGTCAT
TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 185] 5'-
TTACGGATTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 186] 5'-TCATGGTCAT
TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 187] 5'-
TTACGGATTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 188] 5'-TCATGGTCAT
TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

5

[SEQ ID NO: 189] 5'-
TACGGATTCAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 190] 5'-ATCATGGTCAT
TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 191] 5'-
TACGGATTCAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 192] 5'-ATCATGGTCAT
TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 193] 5'-
ACGGATTCACTGGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

10

[SEQ ID NO: 194] 5'-AATCATGGTCAT
TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

[SEQ ID NO: 195] 5' -

GGATTCACTGGCCGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAA-3'

[SEQ ID NO: 196] 5' -GTAATCATGGTCAT

TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCAC-3'

De manera específica, diversos ARNs que se unen a cada ARNm con una energía de unión que varía de 0 a -60 kcal/mol, y se midió el grado de inhibición de la expresión del ARNm diana por cada uno de los ARNs sintéticos.

- 5 En el caso de DsRed2, las células se cultivaron en medio LB hasta la fase exponencial, y después se centrifugó 1 ml del medio a 5.000 rpm para eliminar el componente del medio mientras que se permite que permanezcan solo las células. Se añadió 1 ml de tampón PBS a las células restantes, de manera que las células se mezclasen fácilmente, y después la proteína DsRed2 en las células se excitó a una longitud de onda de 563 nm, y se midió la fluorescencia emitida a partir de las mismas mediante FACS a 582 nm. La intensidad de la fluorescencia emitida se corrigió restando la intensidad de fluorescencia emitida a partir de las células cultivadas en condiciones sin DsRed2. Se tomó como 1 el valor más alto entre las intensidades medidas, y se normalizaron otras intensidades de fluorescencia basadas en el valor.

- 15 En el caso de LacZ, se cultivaron las células en el mismo medio a la misma fase que las usadas en el caso de DsRed2, y después se añadieron 800 µl de una solución de permeabilización (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₃ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, 3,56 µl/ml de betamercaptoetanol) a 20 µl del cultivo. También se añadieron 200 µl de una solución de sustrato (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, 2 mg/ml de o-nitrofenil-beta-D-galactósido (ONPG)). A continuación, se permitió que las células reposasen a 37 °C durante un tiempo suficiente como para que la reacción de desarrollo del color tuviese lugar, y después se añadieron 500 µl de una solución de parada (Na₂CO₃ 1M) para parar la reacción, y se midió la absorbancia a 420 nm. El valor más alto entre los valores del desarrollo de color de LacZ medido a partir de diversos ARNs se tomó como 1, y se normalizaron otros valores basándose en el valor para determinar los valores relativos.

- 25 Como resultado, tal como se puede ver en la FIG. 23 que muestra los resultados de los dos experimentos, cuando la energía de unión osciló desde aproximadamente -10 kcal/mol a -40 kcal/mol, la expresión del gen diana se inhibió de forma lineal. Esto indica que, cuando el ARNs sintético de acuerdo con la presente invención se construyó de tal manera que se une al ARNm diana con una energía de unión de entre -10 kcal/mol y -40 kcal/mol, puede inhibir la expresión del ARNm diana al nivel deseado.

6-2: Medición del cambio en el crecimiento celular con cambio en el número de ARNs sintético introducido del Ejemplo 3

- 30 Cuando un ARNs sintético se introduce adicionalmente en un plásmido con el fin de regular la expresión del gen diana y se produce en células, puede interferir con el crecimiento de las células mediante el uso de la fuente de energía de las células. Por tanto, se examinaron los efectos del ARNs sintético adicionalmente introducido sobre el crecimiento celular y la expresión de proteína intracelular (FIG. 24a). De manera específica, Se introdujeron de 0 a 4 ARNs en un plásmido que tiene un origen de replicación ColE1, y después se midió un cambio en el nivel de expresión del gen DsRed2 en el plásmido. Se introdujo un ARNs sintético en los sitios de EcoRI y KpnI de un plásmido que tiene un origen de replicación ColE1, construyendo de este modo un plásmido (Rmo) que contiene un ARNs. Usando como molde el plásmido construido, se realizó la PCR con los cebadores de las SEQ ID NO: 197 y 198 y el producto de la PCR se escindió con SacI y BglII y se introdujo en el plásmido Rmo, construyendo de este modo un plásmido (Rmo2) que contiene dos ARNs. Usando el Rmo como molde, se realizó la PCR con los cebadores de las SEQ ID NO: 199 y 200 y el producto de la PCR se escindió con SpeI/BamHI y después se introdujo en el plásmido Rmo2, construyendo de este modo un plásmido (Rmo3) que contiene tres ARNs. Usando el Rmo como molde, se realizó la PCR con los cebadores de las SEQ ID NO: 201 y 202, y el producto de PCR se escindió con SphI y Sall, y después se introdujo en el plásmido Rmo3, construyendo de este modo un plásmido (Rmo4) que contiene cuatro ARNs. Los niveles de expresión de DsRed2 de los plásmidos que contienen 0-4 ARNs se determinaron midiendo la intensidad de fluorescencia tal como se describe anteriormente.

- 45 [SEQ ID NO: 197] 5'-AATTAA AGATCT TAACACCGTGCGTGTGTA -3'
 [SEQ ID NO: 198] 5'-GAGCTC TATAAACGCAGAAAGGCCCA -3'
 [SEQ ID NO: 199] 5'-ACTAGT TAACACCGTGCGTGTGTA -3'
 [SEQ ID NO: 200] 5'-GGATCC TATAAACGCAGAAAGGCCCA -3'
 [SEQ ID NO: 201] 5'-GCATGC TAACACCGTGCGTGTGTA -3'
 50 [SEQ ID NO: 202] 5'-GTCGAC TATAAACGCAGAAAGGCCCA -3'

Como resultado, se puede ver que, incluso cuando se introdujeron hasta tres ARNs sintéticos, no influyen en la expresión del DsRed2 (FIG. 24b). Además, se midió si la introducción de 0-4 ARNs sintéticos tiene alguna influencia sobre la tasa de crecimiento de las células. En este caso, se midió la densidad óptica (a 600 nm) en la fase de crecimiento logarítmico de las células y se ajustó en la siguiente ecuación de la curva de crecimiento celular para calcular la constante de crecimiento celular (k) por tiempo:

$$y=y_0 \exp(k \cdot t)$$

en la que y_0 es el valor D.O.600 inicial y t es el tiempo. Como resultado, se podría ver que, cuando se introdujeron hasta tres ARNs sintéticos, el valor de k se redujo ligeramente, pero la reducción no fue significativa. Esto indica que la introducción de hasta tres ARNs en las células no influye de manera significativa en el crecimiento de las células (FIG. 24c).

6-3: Regulación de la eficacia inhibidora de los ARNs sintéticos del Ejemplo 4-5

Como en el caso de pgi del Ejemplo 4-5, la secuencia de unión de ARNs anti-csrA se modificó para cambiar la energía de unión, de tal manera que el nivel de expresión del gen csrA estaba diversificado. De manera específica, se realizó una PCR usando un plásmido pWAS-anti-csrA como molde y los siguientes pares de cebadores, sustituyendo de este modo la secuencia de unión.

[SEQ ID NO: 203] 5'-TTCCTCGTCG GCAACCATT TCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 204] 5'-GAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'
 [SEQ ID NO: 205] 5'-GACTCGTCGA GGCAACCATT ATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 206] 5'-AGAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'
 [SEQ ID NO: 207] 5'-TAACTCGTCG GCAACCATT TCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 208] 5'-GAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'

[SEQ ID NO: 209] 5'-TCGTCGAGTT GGTGGGCAAC CATTATCACC
 GCC-3'

[SEQ ID NO: 210] 5'-TCAGA ATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'

[SEQ ID NO: 211] 5'-CCGTCGAGTT GGTGGGCAAC CATTATCACC
 GCC-3'

[SEQ ID NO: 212] 5'-TCAGA ATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-3'

[SEQ ID NO: 213] 5'-AGTCGAGTTG GTGAGGCAAC CATTATCACC
GCC-3'

[SEQ ID NO: 214] 5'-CGTCA GAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-
3'

[SEQ ID NO: 215] 5'-GTCGAGTTGG TGAGGGCAAC CATTATCACC
GCC-3'

[SEQ ID NO: 216] 5'-AGTCA GAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-
3'

[SEQ ID NO: 217] 5'-TCGAGTTGGT GAGGGCAACC ATTATCACCG CC-
3'

[SEQ ID NO: 218] 5'-CGGTCA GAATCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGC-
3'

5 Diversos anti-csrAs contruidos tal como se describe anteriormente se amplificaron mediante PCR usando pWAS como un molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 105 y 96, y los productos de PCR se escindieron con SpeI/SacI y se unieron con un vector pTyr escindido con XbaI/SacI. De esta forma, se construyeron diversos ARNs anti-csrA con una energía de unión que oscila de -30 kcal/mol a -50 kcal/mol. Los ARNs sintéticos contruidos de este modo se introdujeron en la cepa de *E. coli* S17-1, mostrando el rendimiento más alto, y se midió la producción de tirosina del mismo modo que se describe en el Ejemplo 4-4.

10 Como resultado, como se puede ver en la FIG. 25, el rendimiento más alto se mostró a un valor energético de -39,2 kcal/mol. Este valor de energía de unión es idéntico al de en el caso de los ARNs anti-csrA contruidos anteriormente.

Esto sugiere que los ARNs sintéticos se pueden usar para inhibir la expresión del gen diana y que la eficacia inhibidora de la misma se puede regular.

Ejemplo 7: Identificación de genes adicionales para aumentar la producción de tirosina

15 En este Ejemplo, con el fin de identificar genes que no sean los genes tyrR/csrA, que tienen efectos positivos en la producción de tirosina cuando está inhibida, se construyeron 84 ARNs, que pueden controlar genes que están implicados en la glucólisis y redes del TCA y los reguladores de la transcripción que regulan la expresión de los mismos.

Los genes se enumeran a continuación.

20 accA (acetil-CoA carboxiltransferasa, subunidad alfa)
accB (proteína biotinilada transportadora de biotina-carboxilo)
accC (acetil-CoA carboxilasa)
accD (acetil-CoA carboxiltransferasa, subunidad beta)
aceE (subunidad del componente E1p del complejo piruvato deshidrogenasa)
aceF (piruvato deshidrogenasa)
25 ackA (actividad de propionato cinasa / acetato cinasa)
adiY (AdiY es un regulador transcripcional positivo de unión a ADN que controla la arginina) sistema descarboxilasa (adi))
argB (acetilglutamato cinasa)

	argC (N-acetilglutamilfosfato reductasa)
	argG (argininosuccinato sintasa)
	argH (argininosuccinato liasa)
5	asnC (regulador transcripcional que activa la expresión de asnA, un gen implicado en la síntesis de asparagina)
	aspA (aspartato amoníaco-liasa)
	crp (regulador transcripcional doble CRP)
	csiD (proteína predicha. CsiD es el producto de un gen inducido por la carencia de carbono)
	csiR (represor transcripcional de unión a ADN)
10	cytR (factor de transcripción requerido para el transporte y la utilización de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos)
	dcuA (el transportador DcuA es uno de los tres transportadores conocidos por ser responsable de la absorción de C4-dicarboxilatos tales como fumarato en condiciones anaeróbicas)
15	deoB (fosfopentomutasa)
	deoC (desoxirribosa-fosfato aldolasa)
	deoR (EL represor transcripcional DeoR, para el "regulador de desoxirribosa", está implicado en la expresión negativa de genes relacionados con el transporte y el catabolismo de nucleótidos desoxirribonucleósidos)
	fabH (KASIII, β -cetoacil-ACP sintasas)
20	fadD (acil-CoA sintetasa grasa)
	fadR (el regulón de la degradación de ácidos grasos FadR es un regulador multifuncional doble que ejerce un control negativo sobre el regulón degradativo de los ácidos grasos [Simons80, Simons80a] y el metabolismo de acetato)
	fbp (fructosa-1,6-bisfosfatasa)
25	fnr (FNR es el regulador transcripcional primario que media la transición de crecimiento aeróbico a anaeróbico)
	fruR (FruR es un factor transcripcional doble que desempeña un papel pleiotrópico para modular la dirección del flujo de carbono a través de las diferentes vías metabólicas del metabolismo energético, pero independientemente del regulador CRP)
30	ftsL (proteína de división celular esencial FtsL)
	ftsQ (proteína de división celular esencial FtsQ)
	ftsW (proteína de división celular esencial FtsW)
	ftsZ (proteína de división celular esencial FtsZ)
	fur (regulador transcripcional doble de unión a ADN Fur-Fe ²⁺)
35	gabD (succinato semialdehído deshidrogenasa, dependiente de NADP ⁺)
	gabP (transportador de APC)
	gabT (4-aminobutirato aminotransferasa)
	gadA (subunidad A de glutamato descarboxilasa)
	gadB (subunidad B de glutamato descarboxilasa)
40	gadC (transportador de APC GABA)
	glcC (regulador transcripcional de la familia GntR, activador transcripcional del operón glc)
	glpK (glicerol cinasa)
	glpR (represor de sn-Glicerol-3-fosfato)
	glpX (fructosa 1,6-bisfosfatasa II)
45	gltA (citrato sintasa)
	hflD (regulador de lisogenización)
	ihfA (IHF, el factor de integración del hospedador, es una proteína reguladora global)
	ihfB (IHF, el factor de integración del hospedador, es una proteína reguladora global)
	ilvB (acetohidroxibutanoato sintasa / acetolactato sintasa)
50	ilvC (acetohidroxiácido isomeroreductasa)
	ilvD (dihidroxiácido deshidratasa)
	ilvG_1 (acetolactato sintasa II, subunidad grande, fragmento de N-ter (pseudogen))
	ilvG_2 (acetolactato sintasa II, subunidad grande, fragmento de C-ter (pseudogen))
	ilvH (acetolactato sintasa / acetohidroxibutanoato sintasa)
	ilvL (péptido líder del operón ilvGEDA)
55	ilvM (acetohidroxibutanoato sintasa / acetolactato sintasa)
	ilvN (acetohidroxibutanoato sintasa / acetolactato sintasa)
	ilvX (proteína pequeña predicha)
	lexA (LexA reprime la transcripción de varios genes implicados en la respuesta celular al daño del ADN)
60	lpxC (UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina deacetilasa)
	marA (MarA participa en el control de varios genes implicados en la resistencia a antibióticos, el estrés oxidativo, los disolventes orgánicos y los metales pesados)
	metJ (represor transcripcional MetJ)
	modE (ModE es el regulador principal que controla la transcripción de operones implicados en el transporte de molibdeno y la síntesis de molibdoenzimas y funciones relacionadas con el molibdato)
65	nadB (L-aspartato oxidasa)
	narL (regulador pck (fosfoenolpiruvato carboxicinas) de respuesta de nitrato/nitrito)

PdhR (PdhR, "regulador del complejo piruvato deshidrogenasa", regula genes implicados en el complejo de piruvato deshidrogenasa)

phoP (PhoP-regulador transcripcional doble de unión a ADN fosforilado. Miembro del sistema regulador de dos componentes phoQ/phoP implicado en la adaptación a ambientes bajos en Mg^{2+} y el control de genes de resistencia a ácido)

pnuC (transportador de NMN PnuC)

ppsA (fosfoenolpiruvato sintetasa)

pta (fosfato acetiltransferasa)

purA (adenilosuccinato sintetasa)

purB (adenilosuccinato liasa)

purR (PurR-represor transcripcional de unión a ADN de hipoxantina. El dímero PurR controla varios genes implicados en la biosíntesis del nucleótido purina y en su propia síntesis)

puuE (4-aminobutirato aminotransferasa)

rbsA (transportador ABC de ribosa)

rbsB (transportador ABC de ribosa)

rbsD (ribosa piranasa)

rbsK (ribocinasa)

rbsR (el factor de transcripción RbsR, para el "represor de ribosa", se autorregula de manera negativa y controla la transcripción del operón implicado en el catabolismo y el transporte de ribosa)

rbsB (RcsB-activador transcripcional de unión a ADN BglI. La proteína RcsB para la "síntesis B de la cápsula del regulador", es un regulador de respuesta que pertenece al sistema de fósforo multicomponente RcsF/RcsC/RcsD/RcsA-RcsB y está implicado en la regulación de la síntesis de la cápsula de ácido colánico, la división celular, las proteínas periplásmicas, la motilidad y el ARN pequeño)

rutR (RutR regula los genes implicados directa o indirectamente en la vía del complejo del metabolismo de pirimidina)

serA (alfa-cetoglutarato reductasa / D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa)

serC (fosfohidroxitreonina aminotransferasa / 3-fosfoserina aminotransferasa)

soxS (activador transcripcional doble y participa en la eliminación de superóxido y de óxido nítrico)

sroD (ARN pequeño de SroD)

zwf (glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa)

Además, las secuencias de los cebadores usados para construir los genes son las siguientes:

anti-accA

[SEQ ID NO: 219] 5'-TTCCTTGATTTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 220] 5'-ATTCAGACTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-accB

[SEQ ID NO: 221] 5'-AAGATTAAAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 222] 5'-ACGAATATCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-accC

[SEQ ID NO: 223] 5'-ATTGTTATTGCCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 224] 5'-TTTATCCAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-accD

[SEQ ID NO: 225] 5'-GAACGAATTAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 226] 5'-AATCCAGCTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-aceE

[SEQ ID NO: 227] 5'-TTCCCAAATGACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 228] 5'-ACGTTCTGACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-aceF

5 [SEQ ID NO: 229] 5'-ATCAAAGTACCGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 230] 5'-TTCGATAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ackA

[SEQ ID NO: 231] 5'-GCAACGTTAGTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 232] 5'-

TCCCCGGAACATTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

10

anti-adiY

[SEQ ID NO: 233] 5'-AGCGACCAACCTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 234] 5'-GCAAATCCTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-argB

[SEQ ID NO: 235] 5'-ATT ATCAAACCTGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 236] 5'-TAATGGATTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

15

anti-argC

[SEQ ID NO: 237] 5'-CTGATTGTGGGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 238] 5'-CGTATTCAACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-argG

20 [SEQ ID NO: 239] 5'-CTCAAGCATCTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 240] 5'-AATCGTCGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-argH

[SEQ ID NO: 241] 5'-GGCGGGCGTTTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 242] 5'-CCAAAGTGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

25

anti-asnC

[SEQ ID NO: 243] 5'-CTGATCGACAATGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 244] 5'-ATAATTTTCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-aspA

[SEQ ID NO: 245] 5'-ATTCGTATCGAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 246] 5'-GTTGTTTGACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5

anti-crp

[SEQ ID NO: 247] 5'-AAACCGCAAACAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 248] 5'-GCCAAGCACCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-csiD

[SEQ ID NO: 249] 5'-ACCGCCGTACAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 250] 5'-CAGTGCATTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10

anti-csiR

[SEQ ID NO: 251] 5'-TCTCTGGATGGCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 252] 5'-CGTAATGGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-cytR

15

[SEQ ID NO: 253] 5'-AAGCAGGAAACTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 254] 5'-CTTCGCTTTCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-dcuA

[SEQ ID NO: 255] 5'-GAACTCATCATAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 256] 5'-TACAAC TAGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20

anti-deoB

[SEQ ID NO: 257] 5'-TTTATTATGGTGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 258] 5'-TGCACGTTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-deoC

[SEQ ID NO: 259] 5'-AAAGCAAGCAGCGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 260] 5'-CAGATCAGTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-deoR
[SEQ ID NO: 261] 5'-CGCGAAGAGCGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 262] 5'-ACGTGTTTCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5 anti-fabH

[SEQ ID NO: 263] 5'-
TAATGGAGCTGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 264] 5'-
ACCCTATTGATCGTTGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

anti-fadD
[SEQ ID NO: 265] 5'-TGGCTTAACCGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 266] 5'-AACCTTCTTCAATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10 anti-fadR
[SEQ ID NO: 267] 5'-GCGCAAAGCCCGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 268] 5'-CTTAATGACCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-fbp
[SEQ ID NO: 269] 5'-GGTGAATTTATTGCAACCATTATCACCGCC-3'

15 [SEQ ID NO: 270] 5'-TAACGTTTTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-fnr
[SEQ ID NO: 271] 5'-AAGCGAATTATAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 272] 5'-TTCCGGGATCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

20 anti-fruR
[SEQ ID NO: 273] 5'-GAAATCGCTCGGGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 274] 5'-ATCCAGTTTCACTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-ftsL
[SEQ ID NO: 275] 5'-GTGACAGAAGCTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 276] 5'-TCTGCTGATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5 anti-ftsQ
[SEQ ID NO: 277] 5'-GCTCTGAACACGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 278] 5'-AGCCTGCGACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-ftsW
[SEQ ID NO: 279] 5'-CTCCCTCGCCTGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 280] 5'-AGATAAACGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10 anti-ftsZ
[SEQ ID NO: 281] 5'-ATGGAACCTACCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 282] 5'-TGGTTCAAACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

15 anti-fur
[SEQ ID NO: 283] 5'-AATACCGCCCTAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 284] 5'-GTTATCAGTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-gabD
[SEQ ID NO: 285] 5'-GACAGTAACTTAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 286] 5'-GTTAAGTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20 anti-gabP
[SEQ ID NO: 287] 5'-TCGCAACCACATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 288] 5'-TGATTGCCCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-gabT
[SEQ ID NO: 289] 5'-AAAGAGTTAATGGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 290] 5'-ATTGCTGTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-gadA

[SEQ ID NO: 291] 5'-CTGTTAACGGATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 292] 5'-CTTCTGGTCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5

anti-gadB

[SEQ ID NO: 293] 5'-CAAGTAACGGATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 294] 5'-CTTCTTATCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-gadC

[SEQ ID NO: 295] 5'-GTACAGACAGGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 296] 5'-TGATGTAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10

anti-glcC

[SEQ ID NO: 297] 5'-
ACGTTTCATCTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 298] 5'-
CGCCCTATTTGCGAAGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

anti-glpK

[SEQ ID NO: 299] 5'-AAATATATCGTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 300] 5'-TTTTTCAGTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

15

anti-glpR

[SEQ ID NO: 301] 5'-CAACGTCACAACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 302] 5'-TGTTTGTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

20

anti-glpX

[SEQ ID NO: 303] 5'-CTTGCCATCGAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 304] 5'-TTCTCGTCTCATTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-gltA
[SEQ ID NO: 305] 5'-AAAGCAAACTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 306] 5'-TGTATCAGCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5 anti-hflD
[SEQ ID NO: 307] 5'-TACTATGACATCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 308] 5'-ATTCTTTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-ihfa

[SEQ ID NO: 309] 5'-
TTTTGTAAGCGCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 310] 5'-
GCTGAAATGTCAGAAGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

10 anti-ihfb

[SEQ ID NO: 311] 5'-
TTCTGACTTGGTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 312] 5'-
TTGATAGAAAGACTTGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

anti-ilvB
[SEQ ID NO: 313] 5'-GGCACAACATCGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 314] 5'-CGAACTTGCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

15 anti-ilvC
[SEQ ID NO: 315] 5'-TTCAATACACTGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 316] 5'-GTAGTTAGCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

ES 2 709 105 T3

anti-ilvD

[SEQ ID NO: 317] 5'-CGTTCCGCCACCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 318] 5'-GTACTTAGGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ilvG_1

5 [SEQ ID NO: 319] 5'-CACAGTGGGTGGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 320] 5'-CGCCATTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

anti-ilvG_2

[SEQ ID NO: 321] 5'-AACAACTGTCGGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 322] 5'-TTAACAACAATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

10

anti-ilvH

[SEQ ID NO: 323] 5'-TTATCAGTCTTAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 324] 5'-TATCCGGCGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ilvL

[SEQ ID NO: 325] 5'-CTACGAGTGATTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 326] 5'-AAGGGCTGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

15

anti-ilvM

[SEQ ID NO: 327] 5'-CAGGTCAATGTAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 328] 5'-ATGTTGCATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ilvN

20 [SEQ ID NO: 329] 5'-ACTCATGACAACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 330] 5'-TGTGTTTTGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ilvX

[SEQ ID NO: 331] 5'-ACAAAATTCTGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 332] 5'-GCTGTTATTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

25

anti-lexA

[SEQ ID NO: 333] 5'-ACGGCCAGGCAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 334] 5'-TAACGCTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-lpxC

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 335] 5'-AGGACACTTAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 336] 5'-TTGTTTGATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-marA

[SEQ ID NO: 337] 5'-GCAACGTTAGTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 338] 5'-TCCCCGGAACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5

anti-metJ

[SEQ ID NO: 339] 5'-AGCGGCGAATATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 340] 5'-CCATTCAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-modE

10 [SEQ ID NO: 341] 5'-ATCCTTCTCACCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 342] 5'-TTCGGCCTGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-nadB

[SEQ ID NO: 343] 5'-CCTGAACATTCAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 344] 5'-GAGAGTATTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

15

anti-nagC

[SEQ ID NO: 345] 5'-CCGCCTGGTGTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 346] 5'-ACAAGCTCAGATAGGGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

anti-narL

[SEQ ID NO: 347] 5'-GAACCGGCTACTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 348] 5'-CTGATTACTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20

anti-pck

[SEQ ID NO: 349] 5'-AATGGTTTGACCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 350] 5'-GTTAACGCGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-PdhR
[SEQ ID NO: 351] 5'-AAAATCCGCCAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 352] 5'-GCTGTAGGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5 anti-phoP
[SEQ ID NO: 353] 5'-GTTGTTGAAGACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 354] 5'-CAGTACGCGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-pnuC
[SEQ ID NO: 355] 5'-AGTGTGCAGAATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 356] 5'-AAAAAAATCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10 anti-ppsA
[SEQ ID NO: 357] 5'-GGCTCGTCACCGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 358] 5'-ATTGTTGGACATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

15 anti-purA
[SEQ ID NO: 359] 5'-GTCGTCGTACTGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 360] 5'-GTTGTTACCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-purB
[SEQ ID NO: 361] 5'-TCACTGACCGCCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 362] 5'-GGATAATTCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20 anti-purR
[SEQ ID NO: 363] 5'-AAAGATGTAGCGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 364] 5'-TATTGTTGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-puuE
[SEQ ID NO: 365] 5'-GAATTCATCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 366] 5'-ATTGTTGCTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-rbsA
[SEQ ID NO: 367] 5'-CTTCAGCTTAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 368] 5'-TAATGCTTCCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

5 anti-rbsB
[SEQ ID NO: 369] 5'-AAACTGGCTACCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 370] 5'-TTTCATGTTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-rbsD
[SEQ ID NO: 371] 5'-ACCGTTCTTAATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 372] 5'-GCCTTTTTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

10

anti-rbsK
[SEQ ID NO: 373] 5'-GGCAGCCTCGTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 374] 5'-TGCGTTTTGCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

15 anti-rbsR
[SEQ ID NO: 375] 5'-AAAGATGTTGCCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 376] 5'-CATTGTAGCCAATTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-
3'

anti-rcsB
[SEQ ID NO: 377] 5'-AACGTAATTATTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 378] 5'-CATATTGTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20 anti-rutR
[SEQ ID NO: 379] 5'-GCAGTGAAAACAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 380] 5'-GCCTTGCGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-serA

[SEQ ID NO: 381] 5'-TCGCTGGAGAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 382] 5'-TACCTTTGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-serC

[SEQ ID NO: 383] 5'-TTCAATTTTAGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 384] 5'-GATTGAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-soxS

[SEQ ID NO: 385] 5'-AAAAATTATTCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 386] 5'-CTGATGGGACATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-sroD

[SEQ ID NO: 387] 5'-GCGCGCGGCAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 388] 5'-TTCGTCACGTAATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-zwf

[SEQ ID NO: 389] 5'-CAAACAGCCCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 390] 5'-CGTTACCGCCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

De manera específica, la secuencia de unión de los genes se sustituyó mediante mutagénesis de sitio dirigido usando un plásmido de anti-csrA pWAS como molde y los cebadores descritos anteriormente. Los genes construidos mediante mutagénesis de sitio dirigido se transformaron en células DH5a (Invitrogen) del siguiente modo. Se realizó el cultivo usando un medio de placa que contiene LB-agar, arabinosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina a 25 °C durante 2 días, y las colonias resultantes se cultivaron en medio LB líquido que contiene agarosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina. Después, se purificaron los plásmidos de las células y se secuenciaron, y se usó un plásmido correcto en un experimento posterior. Este cultivo en presencia de arabinosa al 1 % y a 25 °C inhibe de forma eficaz la expresión del ARNs sintético, y por lo tanto es un procedimiento esencial. Además, si el gen cromosómico que está dirigido por el ARNs sintético tiene una influencia muy significativa sobre el crecimiento de las células hospedadoras, el crecimiento de las células será insuficiente cuando no se inhiba la expresión del ARNs sintético. Esta influencia del ARNs sintético puede provocar dificultades en experimentos posteriores, y por lo tanto, se evita. Sin embargo, si el ARNs sintético no tiene influencia sobre el crecimiento celular, el cultivo se puede realizar en ausencia de arabinosa o a 37 °C. Cuando se realiza el cultivo para la producción de un producto metabólico deseado, el ARNs sintético se debería de expresar lo suficiente, y por lo tanto, en este caso, el cultivo se realizó en ausencia de arabinosa y a 37 °C.

El plásmido construido tal como se describe anteriormente se sometió a PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 105 y 96, el producto de PCR se escindió con SpeI/SacI y se unió con un vector pTyr escindido con XbaI/SacI, introduciendo adicionalmente de este modo ARNs.

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 26, la producción de tirosina varió en función del tipo de gen diana, no se encontró un gen que presente una productividad mayor que la combinación génica tyrR/csrA. Por tanto, se pudo ver que la combinación génica tyrR/csrA era la diana óptima para la producción de tirosina en la cepa S17-1. Es obvio que esta selección de gen de alto rendimiento se puede usar en la producción no solo de tirosina, sino también de diversos productos metabólicos.

Ejemplo 8: Producción de microorganismo recombinante usando ARNs sintético y optimización de la

producción de cadaverina mediante la regulación por etapas de la expresión del gen murE**8-1: Producción de microorganismos recombinantes productores de cadaverina usando ARNs sintético**

Además del Ejemplo 5, se potenció el flujo metabólico de la vía de biosíntesis de lisina, y después se realizó la selección de un gen a silenciar para aumentar adicionalmente la producción de cadaverina en un microorganismo recombinante que convierte la lisina a cadaverina usando lisina descarboxilasa (CadA). La FIG. 27 muestra las vías de biosíntesis de cadaverina a partir de glucosa, y estas vías de biosíntesis incluyen las vías de consumo para la producción de otros metabolitos. En este Ejemplo, con el fin de aumentar la producción de cadaverina, se seleccionaron 130 genes candidatos capaces de redes que consumen metabolitos de forma natural, y se construyeron ARNs sintéticos capaces de inhibir la expresión de los genes candidatos. Los 130 genes candidatos incluyen los 84 genes candidatos del Ejemplo 7, y se podrían construir mediante los cebadores usados en el Ejemplo 7. Mientras tanto, los 46 genes candidatos adicionales y los cebadores usados para la construcción de los mismos son los siguientes.

asnA (asparagina sintetasa A)
asnB (asparagina sintetasa B)
15 carA (carbamoil fosfato sintetasa)
carB (carbamoil fosfato sintetasa)
ddlB (D-alanina-D-alanina ligasa B)
deoA (timidina fosforilasa / uracil fosforilasa)
deoD (purina nucleósido fosforilasa de tipo deoD)
20 dpiA (regulador transcripcional doble implicado en el catabolismo anaeróbico de citrato)
fis (Fis, "factor para la estimulación de la inversión", es una pequeña proteína de flexión y de unión a ADN cuyo papel principal parece ser la organización y el mantenimiento de la estructura de nucleótidos)
gadE (GadE controla la transcripción de los genes implicados en el sistema dependiente de glutamato)
gadW (GadW controla la transcripción de los genes implicados en el sistema dependiente de glutamato)
25 gadX (GadX controla la transcripción de los genes implicados en el sistema dependiente de glutamato)
glpF (canal GlpF de glicerol MIP)
ilvY (IlvY, regulador transcripcional doble de unión a ADN)
ivbL (El péptido líder del operón ilvB (Ivbl))
lhgO (L-2-hidroxiglutarato oxidasa)
30 lpd (Lipoamida deshidrogenasa)
lrp (Lrp es un regulador transcripcional doble para al menos el 10 % de los genes en Escherichia coli. Estos genes están implicados en la biosíntesis y el catabolismo de los aminoácidos, en el transporte de nutrientes, en la síntesis de fimbrias y otras funciones celulares, incluyendo el metabolismo de 1-carbono)
metB (O-succinilhomoserina liasa / O-succinilhomoserina(tiol)-liasa)
35 metL (aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa)
mraY (fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido transferasa)
mraZ (Función desconocida)
murE (UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato 2,6-diaminopimelato ligasa)
murF (enzima de adición de D-alanil-D-alanina)
40 murG (N-acetilglucosaminil transferasa)
nac (Nac regula, sin un efector, genes implicados en el metabolismo del nitrógeno en condiciones limitantes de nitrógeno) nadA (quinolato sintasa)
nsrR (NsrR, el "represor sensible a nitrito" regula los genes implicados en la protección celular frente al óxido nítrico (NO))
45 panC (pantotenato sintetasa)
panD (Aspartato 1-descarboxilasa)
pgl (6-fosfogluconolactonasa)
pyrB (aspartato carbamoiltransferasa, subunidad PyrB)
pyrC (dihidrorotasa)
50 pyrL (aspartato carbamoiltransferasa, subunidad PyrI)
rob (Rob es regulador transcripcional doble. Su dominio de N-terminal comparte el 49 % de identidad con MarA y SoxS. Estas proteínas activan un conjunto común de aproximadamente 50 genes, el regulón marA/soxS/rob, implicado en la resistencia a antibióticos, la resistencia a superóxido, y la tolerancia a disolventes orgánicos y a metales pesados).
55 rpe (ribulosa fosfato 3-epimerasa)
talA (transaldolasa A)
thrA (aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa)
thrB (homoserina cinasa)
thrC (treonina sintasa)
60 thrL (péptido líder del operón thr)
tktA (transcetolasa I)
tktB (transcetolasa II)
torR (sistema de dos componentes, familia OmpR, regulador TorR de la respuesta del operón torCAD)

ES 2 709 105 T3

Secuencias de los cebadores usados para la construcción de ARNs

anti-asnA

[SEQ ID NO: 391] 5'-TACATTGCCAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 392] 5'-AGCGGTTTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

5

anti-asnB

[SEQ ID NO: 393] 5'-TTTGGCGTATTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 394] 5'-AATTGAACACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-carA

[SEQ ID NO: 395] 5'-GCGCTATTGGTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 396] 5'-TGACTTAATCAATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

10

anti-carB

[SEQ ID NO: 397] 5'-ACAGATATAAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 398] 5'-ACGTTTTGGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ddIB

15

[SEQ ID NO: 399] 5'-ATCGCGGTCCTGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 400] 5'-TTTATCAGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-deoA

[SEQ ID NO: 401] 5'-CAAGAAATTATTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 402] 5'-TGCGAGAAACAATTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

20

anti-deoD

[SEQ ID NO: 403] 5'-CACATTAATGCAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 404] 5'-TGGGGTAGCCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-dpiA

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 405] 5'-
TAATGGAGCTGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 406] 5'-
ACCCTATTGATCGTTGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

anti-fis
[SEQ ID NO: 407] 5'-CGCGTAAATTCTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 408] 5'-TTGTTCGAACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5 anti-gadE
[SEQ ID NO: 409] 5'-ATGACGAAAGATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 410] 5'-GAGAAAAATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-gadW
[SEQ ID NO: 411] 5'-TGCTCGGTGATCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 412] 5'-GACATGAGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10 anti-gadX
[SEQ ID NO: 413] 5'-CATGGGAATTGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 414] 5'-TAGTGATTGCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

15 anti-glpF
[SEQ ID NO: 415] 5'-TCAACCTTGAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 416] 5'-TGTTTGAATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-ilvY
[SEQ ID NO: 417] 5'-GATCTGAAAACCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 418] 5'-GCGTAAATCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20 anti-ivbL
[SEQ ID NO: 419] 5'-ATGCTCAACGCAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 420] 5'-GGAAGTAGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-lhgO
[SEQ ID NO: 421] 5'-GTGATTATTGGCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 422] 5'-AAAATCATACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

5 anti-lpd
[SEQ ID NO: 423] 5'-ATCAAACTCAGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 424] 5'-TTCAGTACTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-l ㄱ
[SEQ ID NO: 425] 5'-AAGAAGCGCCCTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 426] 5'-GCTATCTACCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

10 anti-metB
[SEQ ID NO: 427] 5'-ACAGGCCACCATGCAACCATTATCACCGCC-3'
[SEQ ID NO: 428] 5'-TTACGCGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

15 anti-metL
[SEQ ID NO: 429] 5'-GCGCAGGCAGGGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 430] 5'-AATCACACTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-mraY
[SEQ ID NO: 431] 5'-CTGGCCGAACATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 432] 5'-CCAAACTAACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

20 anti-mraZ
[SEQ ID NO: 433] 5'-GCAACGTTAGTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 434] 5'-TCCCCGGAACATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-murE
[SEQ ID NO: 435] 5'-AATTTGCGCGACGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 436] 5'-ACGATCTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-murF

[SEQ ID NO: 437] 5'-AACCCCTTAGCCAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 438] 5'-ACGCTAATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3' anti-murG

[SEQ ID NO: 439] 5'-GGAAAGCGATTAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 440] 5'-TTGACCACTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-nac

[SEQ ID NO: 441] 5'-CGCCTGAAATACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 442] 5'-TCTGAAGTTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-nadA

[SEQ ID NO: 443] 5'-TTTGATCCAGACGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 444] 5'-CATTACGCTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-nsrR

[SEQ ID NO: 445] 5'-
ACTCGTTAACTGCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 446] 5'-
TTCCTGATTACGGAGCAACCATTATCACCGCCAGA-3'

anti-panC

[SEQ ID NO: 447] 5'-GAAACCCTGCCGGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 448] 5'-GATAATTAACACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-panD

[SEQ ID NO: 449] 5'-ATGCTGCAGGGCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 450] 5'-CGTGCGAATCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-
3'

anti-pgl

[SEQ ID NO: 451] 5'-GTTTATATCGCCGCAACCATTATCACCGCC-3'

ES 2 709 105 T3

[SEQ ID NO: 452] 5'-TGTTTGCTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-pyrB

[SEQ ID NO: 453] 5'-CTATATCAGAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 454] 5'-CGGATTAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

5

anti-pyrC

[SEQ ID NO: 455] 5'-TCCCAGGTATTAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 456] 5'-TGGTGCAGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-pyrI

[SEQ ID NO: 457] 5'-AATAAATTGCAGGCAACCATT ATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 458] 5'-ATCGTGTGTCATTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

10

anti-rob

[SEQ ID NO: 459] 5'-GGCATTATTCGCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 460] 5'-GGCCTGATCCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-rpe

15

[SEQ ID NO: 461] 5'-TTGATTGCCCCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 462] 5'-ATACTGTTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-talA

[SEQ ID NO: 463] 5'-GACGGCATCAAAGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 464] 5'-TAACTCGTTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

20

anti-talB

[SEQ ID NO: 465] 5'-TTGACCTCCCTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 466] 5'-TTTGTCCGTCATTTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-thrA

[SEQ ID NO: 467] 5'-AAGTTCGGCGGTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 468] 5'-CAACACTCGCATTCTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-thrC

[SEQ ID NO: 469] 5'-AATCTGAAAGATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 470] 5'-GTAGAGTTTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

5

anti-thrL

[SEQ ID NO: 471] 5'-AGCACCACCATTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 472] 5'-AATGCGTTTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

anti-ktA

[SEQ ID NO: 473] 5'-AAAGAGCTTGCCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 474] 5'-ACGTGAGGACATTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

10

anti-ktB

[SEQ ID NO: 475] 5'-GACCTTGCCAATGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 476] 5'-TTTTCGGGACATTTCTGTTGG GCCATTGCATTG-

3'

anti-torR

15

[SEQ ID NO: 477] 5'-ATT GTTATTGTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 478] 5'-GTGATGTGGCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

La construcción de cada ARNs sintético, la transformación del ARNs sintético en XQ56 (que contiene un plásmido pl5CadA), y la medición de la concentración de cadaverina se realizaron del mismo modo que se describe en el Ejemplo 5.

20 Como resultado, cuando la producción de cadaverina en la cepa básica se tomó como el 100 % del mismo modo que el Ejemplo 5, la inhibición del gen murE mostró la producción de cadaverina más alta (el 55 %, 2,15 g/l) y la inhibición de ack mostró una producción de cadaverina de 1,96 g/l (el 40 %). Los resultados globales se muestran en la FIG. 27, y los 37 genes diana que aumentan la producción de cadaverina se muestran en la Tabla 5 a continuación.

25

Tabla 5: 37 genes diana que aumentan la producción de cadaverina

Gen	Aumento relativo de cadaverina (%) [*]	DT	Gen esencial ^{**}	Descripción
murE	154,495	11,50508	Y	UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato 2,6-diaminopimelato ligasa

(continuación)

Gen	Aumento relativo de cadaverina (%)*	DT	Gen esencial **	Descripción
ackA	140,2173913	63,90312836	Y	actividad de propionato cinasa / acetato cinasa
thrL	133,9679	2,929674		péptido líder del operón thr
PdhR	131,3433	3,18948		PdhR, "regulador del complejo piruvato deshidrogenasa", regula genes implicados en el complejo de piruvato deshidrogenasa
ilvG_1	127,484472	7,246746515		acetolactato sintasa II, subunidad grande, fragmento de N-ter (pseudogen)
metB	123,6249	9,932535		O-succinilhomoserina liasa / O-succinilhomoserina(tiol)-liasa
carB	121,7908903	5,78275732		carbamoil fosfato sintetasa
serC	120,2898551	5,85595678		fosfohidroxitreonina aminotransferasa / 3-fosfoserina aminotransferasa
ilvN	118,73706	5,123962183		acetohidroxibutanoato sintasa / acetolactato sintasa
crp	117,6501035	23,49702658		regulador transcripcional doble CRP
ilvD	117,494824	18,0070671		dihidroxiácido deshidratasa
ilvY	117,0807453	12,59030708		IlvY regulador transcripcional doble de unión a ADN
glpK	116,5113872	0,365997299		glicerol cinasa
glpF	116,1490683	19,03185954		canal GlpF de glicerol MIP
pta	113,92	4,9		fosfato acetiltransferasa
tktA	113,5093168	15,73788385	Y	transcetolasa I
hflD	113,3540373	4,099169746		regulador de lisogenización
deoA	113,0952381	6,368352998		timidina fosforilasa / uracil fosforilasa
gadE	112,6811594	18,51946332		GadE controla la transcripción de los genes implicados en el sistema dependiente de glutamato
rbsk	110,5072464	2,708380011		ribocinasa
ilvL	110,4554865	2,488781632		péptido líder del operón ilvGEDA
ilvC	110,1449275	6,0023557		acetohidroxiácido isomerorreductasa
accA	109,7826087	13,54190005	Y	acetil-CoA carboxitransferasa, subunidad alfa
ilvM	108,3850932	11,85831248		acetohidroxibutanoato sintasa / acetolactato sintasa
argB	108,1780538	3,659972988		acetilglutamato cinasa
thrA	106,1544	11,37465		asparato cinasa / homoserina deshidrogenasa
carA	105,9006211	5,123962183		carbamoil fosfato sintetasa

(continuación)

Gen	Aumento relativo de cadaverina (%) [*]	DT	Gen esencial ^{**}	Descripción
fbp	105,8488613	3,293975689		fructosa-1,6-bifosfatasa
rbsD	105,6935818	8,051940573		ribosa piranasa
panD	105,5383023	0,951592977		Asparato 1-descarboxilasa
aspA	104,1407867	5,123962183		aspartato amoníaco-liasa
rbsB	102,898507	6,734350297		RcsB-activador transcripcional de unión a ADN BglJ. La proteína RcsB para la "síntesis B de la cápsula del regulador", es un regulador de respuesta que pertenece al sistema de fósforo multicomponente RcsF/RcsC/RcsD/RcsA-RcsB y está implicado en la regulación de la síntesis de la cápsula de ácido colánico, la división celular, las proteínas periplásmicas, la motilidad y el ARN pequeño.
ivbL	102,0186335	5,343560562		El péptido líder del operón ilvB (IvbL)
lexA	101,8115942	0,658795138	Y	LexA reprime la transcripción de varios genes implicados en la respuesta celular al daño del ADN
rbsA	101,77	4,83		transportador ABC de ribosa
murF	101,1368	5,956948	Y	enzima de adición de D-alanil-D-alanina
thrC	100,2564	3,703182		treonina sintasa

* La producción de cadaverina (1,4 g/l) en una cepa de *E. coli* diseñada genéticamente documentada en las referencias [Qian, Z. -G. y col. Biotechnol Bioeng 108:93-103, 2011] se tomó como el 100 %.

** Gen esencial: gen esencial para la supervivencia de la célula. Véase los datos de <http://tubic.tju.edu.cn/deg/> para la información del mismo.

5 **8-2: Optimización de la producción de cadaverina mediante la regulación por etapas de la expresión del gen murE**

Como en el caso de anti-csrA mencionado en el Ejemplo 6, en este Ejemplo, la energía de unión de anti-murE estaba diversificada de tal manera que la expresión del gen murE se regulaba por etapas, y se examinó si la regulación de la expresión del gen murE tenía alguna influencia sobre la producción final de cadaverina.

- 10 De acuerdo con el procedimiento de preparación de ARNs sintético descrito en el Ejemplo anterior, se construyeron diversos anti-murE (ARNs sintéticos) mediante mutagénesis de sitio dirigido usando los siguientes pares de cebadores, y los plásmidos pWAS de anti-murE construidos (FIG. 18) se transformaron en la cepa XQ56 que contiene el plásmido pI5CadaA.

15 [SEQ ID NO: 479] 5'-GATCGTGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 480] 5'-TGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'
 [SEQ ID NO: 481] 5'-GTCGTAAGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 482] 5'-CTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'
 [SEQ ID NO: 483] 5'-TCGTAATTGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 484] 5'-TCTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'
 20 [SEQ ID NO: 485] 5'-TAATTTGCGCGGCAACCATTATCACCGCC-3'
 [SEQ ID NO: 486] 5'-CGATCTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'
 [SEQ ID NO: 487] 5'-ATTTGCGCGACCTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 488] 5'-TACGATCTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-

3'

[SEQ ID NO: 489] 5'-TTTGC GCGACCTTCGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 490] 5'-

TTACGATCTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

[SEQ ID NO: 491] 5'-TTGCGCGACCTTCTTGCAACCATTATCACCGCC-3'

[SEQ ID NO: 492] 5'-

ATTACGATCTGCCACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG-3'

5 Como resultado, como se puede ver en la FIG. 28, la energía de unión osciló desde -20 kcal/mol a -50 kcal/mol. Como en el caso de anti-csrA, el anti-murE básico construido (recuadro azul, FIG. 28) presentó la producción más alta de cadaverina, y a los valores de energía de unión mayores o menores que el del anti-murE básico, se redujo la producción de cadaverina.

10 En este Ejemplo, con el fin de examinar si la cantidad de proteína murE realmente cambia por anti-murE que tiene diferente energía de unión, se cultivó la cepa XQ56 transformada con el plásmido p15CadA/pWAS-anti-murE, seguido por el análisis 2D-PAGE. En este Ejemplo, la eliminación de solo anti-murE, y los anti-murE que tienen valores de energía de unión de -19,2, -36,5, -40,9 y -48,7 kcal/mol, se usaron. De manera específica, se recolectaron las células de cada muestra cultivada en matraz y se resuspendieron en un tampón de resuspensión (Tris-HCl 10 mM (a pH 8,0), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, ditiotritol 0,5 mM, y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1 % en p/v). La suspensión se mezcló con tampón de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, Tris 40 mM, ditiotritol 65 mM, y 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) al 4 % en p/v), y después se centrifugó a 13000X g y 4 °C durante 10 minutos, y se recolectó el sobrenadante. Se midió la concentración de proteína en el sobrenadante mediante el procedimiento Bradford (Bradford MM, Anal Biochem 72, 248254, 1976), y se mezclaron 150 ug de la proteína con 340 ul de tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, ditiotritol 20 mM, CHAPS al 2 % p/v, tampón de gradiente de pH inmovilizado al 0,8 % en p/v (Amersham Biosciences, Uppsala, Suiza), y mezcla de inhibidor de proteasa al 1 % en v/v) y después se cargó en geles de tiras secas de inmovilina (IPG) (18 cm, a pH 3-10 NL; Amersham Biosciences). La tira de IPG cargada con la muestra se rehidrató en el Protean IEF Cell durante 12 horas, se centró a 20 °C y 250 V durante 3 horas, y después se mantuvo a 6000 V hasta que alcanzó 65 kV h. La tira se equilibró en una solución (que contiene urea 6 M, Tris-HCl 0,375 M (a pH 8,8), glicerol al 20 % en p/v, SDS al 2 % en p/v, ditiotritol 130 mM, y azul de bromofenol al 0,002 % en p/v) a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se equilibró de nuevo en una solución (que tiene la misma composición que la mencionada anteriormente, excepto en que contiene iodoacetamida 135 mM en lugar de DTT) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, la tira se transfirió a gel de SDS-poliacrilamida al 12 % en p/v. La mancha de la proteína se examinó con el kit de tinción PlusOnes Silver Staining Kit (Amersham Biosciences) y se analizó cuantitativamente con colorante de azul brillante de Coomassie.

Para la cuantificación de la proteína MurE, se midió la cantidad de proteína MurE en relación con el nivel de expresión de la proteína de mantenimiento EF-Tu, y se compararon los valores medidos.

35 Como resultado, como se puede ver en la FIG. 29, a medida que la energía de unión de anti-murE (ARNs sintético) usado aumentaba, la cantidad de proteína MurE disminuía. Por tanto, se puede ver que la cantidad de proteína diana se puede diversificar de forma eficaz mediante el diseño adecuado de la energía de unión del ARNs sintético.

40 La XQ56 con el anti-murE seleccionado finalmente se fermentó en las mismas condiciones que las documentadas en las referencias (Qian y col., Biotechnol. Bioeng. 108, 93-103 (2011)). Como resultado, como se muestra en la FIG. 30, se podría obtener un total de 12,6 g/l de cadaverina, y esta producción era aproximadamente el 31 % mayor que la producción documentada anteriormente (9,6 g/l), documentada en las referencias. En el experimento de fermentación, se cultivaron colonias individuales en medio R/2 que contiene 10 g/l de glucosa, 10 g/l de arabinosa y 3 g/l de (NH₄)₂SO₄ a 25 °C, y después se sometieron a fermentación de lote alimentado en un frasco de 6,6 l que tiene 2 l de los mismos componentes del medio (salvo arabinosa) que se describen anteriormente. El pH se mantuvo a un pH constante de 6,8 con KOH 10 M y la solución de alimentación contenía 577 g/l de glucosa, 7 g/l de MgSO₄·7H₂O, y 115 g/l de (NH₄)₂SO₄. El medio R/2 contenía 2 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 6,75 g/l de KH₂PO₄, 0,85 g/l de ácido cítrico, 0,7 g/l de MgSO₄·7H₂O, y 5 ml/l de solución de metales traza (Tabla 2).

Aplicabilidad industrial

50 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un ARNs sintético que puede inhibir de manera eficaz la expresión del gen diana sin modificar la secuencia del gen diana, a diferencia del procedimiento de delección génica, y un procedimiento para preparar el ARNs sintético. El ARNs sintético de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que el grado de inhibición del gen diana se puede controlar regulando la capacidad del ARNs sintético para unirse al ARNm del gen diana. El uso del ARNs sintético que regula la expresión del gen diana hace posible construir de manera eficaz un microorganismo recombinante sin usar un procedimiento de delección

génica y reducir la expresión del gen diana y, por lo tanto, el ARNs sintético es útil para la producción de microorganismos recombinantes. Asimismo, el ARNs sintético se puede aplicar rápidamente a diversas cepas, y por lo tanto, es muy adecuado para la medición de las capacidades metabólicas de las cepas y la selección de la cepa más adecuada. Además, los microorganismos recombinantes, que se obtienen mediante la manipulación del flujo metabólico usando el ARNs sintético y producir tirosina o cadaverina con alta eficacia, son útiles en los campos de los fármacos e industrial. En otras palabras, el uso del ARNs de acuerdo con la presente invención puede hacer fácil seleccionar genes diana cuya expresión se va a inhibir para la producción altamente eficaz de metabolitos. Por consiguiente, el ARNs sintético se puede usar para construir cepas recombinantes para la producción eficaz de diversos metabolitos y establecer procedimientos eficaces para la producción de diversos metabolitos, y por lo tanto, es altamente útil.

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology

<120> Nuevo ARN pequeño de regulación de la síntesis y el procedimiento para preparar el mismo

<130> PP-B1178

<150> KR 10-2012-0003609

<151> 11/01/2012

<160> 492

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2561

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pWA

<400> 1

ES 2 709 105 T3

catatgagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac	60
tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga gatagggtgcc tcaactgatta agcattggta	120
actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt	180
taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga	240
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc	300
tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggt	360
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc	420
gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc	480
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg	540
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatatg ttaccggata aggcgcagcg	600
gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga	660
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc	720
ggacaggatc ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg	780
gggaaacgcc tggatatctt atagtctgtt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg	840
atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt	900
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc	960
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg	1020
aacgaccgag cgcagcaggt cagtgagcga ggaacatatg tgacagctta tcgcatgcct	1080
aggtaaacc aggaggtata gggcgaattg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggt	1140
atcgataagc ttgatatcga attcctgcag cccgggggat ccactagttc tagagcggcc	1200

gccaccgcgg tggagctcca gcttttgttc ccttttagtga gttagtgtct aggttcccac 1260
tagatctcaa atgtgctggg cacatgtttg atttataagg gattttgccg atttcggcct 1320
attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa 1380
cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt 1440
tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 1500
ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 1560
ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga 1620
tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 1680
gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct 1740
gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcgcgat 1800
acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 1860
tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata aactgcggc 1920
caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat 1980
gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 2040
cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 2100
tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg aggcggataa 2160
agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggtggc tggtttattg ctgataaatc 2220
tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc 2280
ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gtagtcaggca actatggatg aacgaaatag 2340
acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttaa 2400
ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 2460
gatccttttt gataatctca acatgttgcc aacttactga tttagtgtat gatggtgttt 2520
ttgaggtgct ccagtggctt ctgtttctat cagctgtccc t 2561

<210> 2
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> cebador

<400> 2
aagctggagc tcaatactag tcgatttatt atgacaactt gacggctaca tc 52

10

<210> 3
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> cebador

<400> 3
gaattcaatt aattaattaa aattccaaa aaaacgggta tggagaa 47

ES 2 709 105 T3

<210> 4
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 gggaatttta attaaaagga gacccgggat atgagcacao aaaagaaacc attaaca 57

10 <210> 5
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

15 <400> 5
 aattatgaat tcttagccaa acgtctctc agg 33

<210> 6
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 6

 aatatgaatt cccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg 60
 ttttatctgt tgtttgcgg tgaacgctct ctactagagt c 101

25 <210> 7
 <211> 97
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 7

 aatattctag atataaacgc agaaaggccc acccgaagggt gagccagtgt gactctagta 60

 gagagcggtc accgacaaac aacagataaa acgaaag 97

35 <210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <400> 8
 tttttctcg agccaggcat caaataaaac gaa 33

<210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

ES 2 709 105 T3

	<223> cebador		
	<400> 9		
	gaattgggta cctataaacg cagaaaggcc cacc	34	
5	<210> 10		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
10	<400> 10		
	gaagttatcg ctagtcatg gcc	23	
	<210> 11		
	<211> 20		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 11		
	ccccacaacg gaacaactct	20	
20	<210> 12		
	<211> 84		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> cebador		
	<400> 12		
	ctgcaggaat tctaacaccg tgcgtgttga ctattttacc tctggcggtg ataatggttg	60	
	ctttctgttg ggccattgca ttgc	84	
	<210> 13		
	<211> 29		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 13		
35	ctcgagaaaa aaagcccga cgactgttc	29	
	<210> 14		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 14		
	ctgcaggaat tctaacaccg tgcgtgttga ctattttacc tctggcggtg ataatggttg	60	
	cgatgaagca agggggtgc	79	
	<210> 15		
45	<211> 34		

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
5	<400> 15		
	ctcgagaaaa aaaaccagca ggtataatct gctg	34	
	<210> 16		
	<211> 74		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 16		
	ctgcaggaat tctaacaccg tgcgtgttga ctattttacc tctggcgggtg ataatggttg	60	
	ctcatttctg aatg	74	
15	<210> 17		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> cebador		
	<400> 17		
	tcgagaaaaa aaaccgaatg cgaggcatcc ggttgaaata ggggtaaaca gacattcaga	60	
	aatgagcaac cattatcac	79	
	<210> 18		
	<211> 20		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 18		
30	agtgggaacc tagacactaa	20	
	<210> 19		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> cebador		
	<400> 19		
	ctaggtaaac ccaggagg	18	
	<210> 20		
40	<211> 2179		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> pR15CA		
45	<400> 20		

ES 2 709 105 T3

agatctcaaa tgtgctgggc cctggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat gatagcgcca 60
 tcgagatttt caggagctaa ggaagctaaa atggagaaaa aaatcactgg atataccacc 120
 gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa 180
 tgtacctata accagaccgt tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa 240
 aataagcaca agttttatcc ggcctttatt cacattcttg ccgcctgat gaatgctcat 300
 ccggaatttc gtatggcaat gaaagacggt gagctggtga tatgggatag tgttcaccct 360

 tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa acgttttcat cgctctggag tgaataccac 420
 gacgatttcc ggcagtttct cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc 480
 tggcctattt ccctaaaggg tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg 540
 tgagtttcac cagttttgat ttaaactggt ccaatatgga caacttcttc gccccgttt 600
 tcaccatggg caaatattat acgcaaggcg acaagggtgct gatgccgctg gcgattcagg 660
 ttcacatgc cgtctgtgat ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt 720
 actgcgatga gtggcagggc ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgccttaaa 780
 cgcactagtc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt 840
 ttatctgttt ttgtcgggtga acgctctcta ctagagtcac actggctcac cttcgggtgg 900
 gcctttctgc gtttatagca tgcgtccaac ttactgattt agtgtatgat ggtgtttttg 960
 aggtgctcca gtggcttctg tttctatcag ctgtccctcc tgttcagcta ctgacggggt 1020
 ggtgcgtaac ggcaaaagca ccgccggaca tcagcgctag cgagtgat actggcttac 1080
 tatgttggca ctgatgaggg tgcagtgaa gtgcttcatg tggcaggaga aaaaaggctg 1140
 caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc cgcttcctcg ctactgact 1200
 cgctacgctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaatggc ttacgaacgg ggcggagatt 1260
 tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagtga agggccgcg caaagccgtt 1320
 tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc tgacgctcaa atcagtgggtg 1380
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggcggct ccctcgtgcg 1440
 ctctcctgtt cctgccttcc ggtttaccgg tgcattccg ctgttatggc cgcgtttgtc 1500
 tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg ctccaagctg gactgtatgc 1560
 acgaaccccc cgttcagtcc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 1620
 acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac tggtaattga tttagaggag 1680
 ttagtcttga agtcatgctc cggttaaggc taaactgaaa ggacaagttt tggtgactgc 1740
 gctcctcaa gccagttacc tcggttcaaa gagtggtag ctacagagaac cttcgaaaaa 1800
 ccgccctgca aggcgggtttt ttcgttttca gagcaagaga ttacgcgcag accaaaacga 1860
 tctcaagaag atcatcttat taatcagata aaatatttct agatttcagt gcaatttatc 1920
 tcttcaaag tagcacctga agtcagcccc atacgatata agttgtaatt ctcatgtttg 1980
 acagcttata gcatgcctag gtaaacccag gaggtatagg gcgaattggg taccgggccc 2040
 ccctcagagg tcgacgggat cgataagctt gatatcgaat tcctgcagcc cgggggatcc 2100
 actagttcta gagcggccgc caccgcggtg gagctccagc ttttgttccc tttagtgagt 2160
 tagtgtctag gttccact 2179

	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 21		
	ataattctcg agccaggcat caaataaaac gaaaggct	38	
10	<210> 22		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 22		
	aattaggtac ctataaacgc agaaaggccc acc	33	
	<210> 23		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 23		
	aattagaatt cgtggataac cgtattaccg cctttg	36	
25	<210> 24		
	<211> 67		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
30	<400> 24		
	aattactcga gaattattta attaataaaag ttaatttttt ttttttgtgt gaaattgtta	60	
	tccgctc	67	
	<210> 25		
	<211> 37		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 25		
	aattattaat taaaaggagg acaaatatat ggcgagc	37	
40	<210> 26		
	<211> 74		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador		
	<400> 26		

	aattactcga gttacgccac cagggcatag ttttcatcat ttgccgccag gaacagggtgg	60
	tggcgggccct cggt	74
5	<210> 27 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 27 gcgagcagtg agaacgtcat aagtcaact tcagaattgc ggcatccca 50	
10	<210> 28 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador <400> 28 catatatttg tctccttaa atcaccgcc agcagattat acctg 45	
20	<210> 29 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
25	<400> 29 gcgagcagtg agaacgtcat gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa 48	
30	<210> 30 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 30 catatatttg tctcctttc atttctgaat gtctgttac cccta 45	
35	<210> 31 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 31 gcgagcagtg agaacgtcat gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa 48	
45	<210> 32 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 32	

	catatatttg tctctcttc atttctgaat gtctgtttac ccc	43
	<210> 33	
	<211> 26	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 33	
10	gacaaatata tggcgagcag tgagaa	26
	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 34	
	tttctgttg gccattgcat tgc	23
	<210> 35	
20	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 35	
25	caccgagcaa ccattatcac cgccaga	27
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 36	
	atgacgttct cactgctcgc ca	22
	<210> 37	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 37	
	gcgagcagtg agaacgtcat	20
	<210> 38	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 38	
	tttctgttg gccattgcat tgc	23
50	<210> 39	

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 39
 caccgagttc atgcgcttgc aaccattatc accgccaga 39

 <210> 40
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 40
 15 atgacgttct cactgctgc ca 22

 <210> 41
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 <400> 41
 tggtcaccgg gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa 38

 <210> 42
 25 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 30 <400> 42
 gctcctcgct ttctgtggg ccattgcatt gccac 35

 <210> 43
 <211> 37
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 43
 catcctggtg caaccattat caccgccaga ggtaaaa 37

 <210> 44
 40 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> cebador

 <400> 44
 ggcaccaccc cggtaacag ctctcgctt tct 33

 <210> 45
 50 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 45		
	gggtggtgcc gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa	38	
5	<210> 46		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 46		
	cggatgaacat ttctgttggg ccattgcatt gccac	35	
	<210> 47		
	<211> 37		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
20	<400> 47		
	cgagctggag caaccattat caccgccaga ggtaaaa	37	
	<210> 48		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 48		
	accaggatgg gcaccacccc ggtgaacatt tct	33	
	<210> 49		
30	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
35	<400> 49		
	catcctggtc gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa	38	
	<210> 50		
	<211> 35		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 50		
	ggcaccacct ttctgttggg ccattgcatt gccac	35	
45	<210> 51		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> cebador		

	<400> 51 ggcgacgtag caaccattat caccgccaga ggtaaaa	37
5	<210> 52 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 52 gtccagctcg accaggatgg gcaccacctt t	31
	<210> 53 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 53 actacaagaa ggcgaacat tatcaccgcc aga	33
20	<210> 54 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
25	<400> 54 cggggatgtc ggtttctgtt ggccattgc attgc	35
30	<210> 55 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
	<400> 55 caagaagctg tcgcaacat tatcaccgcc aga	33
35	<210> 56 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 56 tagtcgggga tttctgttg ggccattgca ttgc	34
45	<210> 57 <211> 74 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 57	

	ttaattaaaa tctactctag aggtgcaggg gcaggcgctg gtgcgggtgc catggcgagc	60
	agtgagaacg tcat	74
5	<210> 58 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 58 aatactccgc ggtataaacg cagaaaggcc cacc	34
10	<210> 59 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 59 tcattttgat tgctccttt tctgtgggc cattgcattg c	41
15	<210> 60 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 60 ctgaagcgca aaatgatgc aaccattatc accgccaga	39
20	<210> 61 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 61 ccatccgttt ttctccttt tctgtgggc cattgcattg c	41
25	<210> 62 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 62 gaacaagatg gattgcgcaa ccattatcac cgccaga	37
30	<210> 63 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 63	

	aatcatgtaa acgactcctt ttctgttg gccattgcat tgc	43
	<210> 64	
	<211> 79	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 64	
	aattattaat taaaatctac atcgatggtg caggggcagg cgctggtgcg ggtgccatgg	60
	cgagcagtga gaacgtcat	79
10	<210> 65	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 65	
	aattattaat taaggagcaa tcaaatgaa catcaagaac atcaacgcg	49
	<210> 66	
	<211> 40	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 66	
25	aattaatcga tattttaag gtatggacaa ttaatggcgc	40
	<210> 67	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 67	
	aattattaat taaaaggaga aaaacggatg gctg	34
	<210> 68	
35	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 68	
40	aattaatcga ttgacaactt gacggctaca tcattca	37
	<210> 69	
	<211> 50	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	

	<400> 69 aattattaat taaggagtcg ttacatgat tgaacaagat ggattgcacg	50
5	<210> 70 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 70 aattaatcga tgaagaactc gtcaagaagg cgata	35
	<210> 71 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 71 aattatgaat tcatgcaaaa agacgcgctg aataac	36
20	<210> 72 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
25	<400> 72 taattgagct cttagccac gcgagccgtc a	31
30	<210> 73 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
	<400> 73 atcatatcta gaaggagggtt attcatgtcc tcacgtaaag a	41
35	<210> 74 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 74 ttcgttgcat gcttacagca gttctttg	29
45	<210> 75 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
50	<400> 75 aattaagagc tcttaattaa cgggttaaata tgcaaagata aatgcg	46

	<210> 76		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 76		
	aattaaacta gattatttct tcagttcagc cagg	34	
10	<210> 77		
	<211> 90		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 77		
	gagctcctga tggctagctc agtcctaggg attatgctag ccatatcgaa aggatagtct	60	
	tgataacccat aagtttaatt aagcggccgc	90	
20	<210> 78		
	<211> 90		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 78		
	gcggccgctt aattaaactt atggttatca agactatcct ttcgatatgg ctagcataat	60	
	ccctaggact gagctagcca tcaggagctc	90	
25	<210> 79		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 79		
	ataattgaat tccagcat caaataaac gaaaggc	37	
35	<210> 80		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
40	<400> 80		
	cgaattgggt acctataaac gcagaaaggc ccacccg	37	
	<210> 81		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		

	<223> cebador	
	<400> 81 aatcatttaa ttaaacggct cgcgtggctt aag	33
5	<210> 82 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 82 aattaagaat tcttactggc gattgtcatt cgcc	34
	<210> 83 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 83 tttggcctcg cgtcgtgca	19
20	<210> 84 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 84 atagatgcct cgcgctccg	19
	<210> 85 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 85 tgcagcgttt tcagagtgaag agcc	24
	<210> 86 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 86 cgtaatcgcc gaaccagtgc tc	22
45	<210> 87 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
50	<400> 87	

	ttaattaaag gagaaaaaat gaattatcag aacgacgatt tac	43
	<210> 88	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 88	
10	gaattcttac ccgacgacgcg ctttt	25
	<210> 89	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 89	
	aattaattaa ttaagactct cgcaatatct tatg	34
	<210> 90	
20	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 90	
25	aattaagaat tcttagttgc ttccagcat gtg	33
	<210> 91	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 91	
	ttaattaagg agaaaaaat gaccgtcttt aagcatattg cca	43
35	<210> 92	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 92	
	gaattcttaa gggagaatat cgtggtctgt tttt	34
	<210> 93	
	<211> 25	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 93	
	aatatgatca cccacaata tctcg	25
50	<210> 94	

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 94	
	gagaaactca cctgccgct	19
10	<210> 95	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 95	
	aattaaacta gtctgatggc tagctcagt	29
20	<210> 96	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 96	
	attaatgagc tcataatttc tagatataaa cgcagaaagg cc	42
25	<210> 97	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 97	
	agtcttttgt gcaaccatta tcaccgcc	28
35	<210> 98	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 98	
	tccagacgca ttttctgttg ggccattgca tt	32
40	<210> 99	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 99	
	tattccgcat tggcaaccat tatcaccgcc	30
50	<210> 100	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 709 105 T3

	<220> <223> cebador	
	<400> 100 ttgttcgttc attttctgtt gggccattgc	30
5	<210> 101 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 101 actcgtcgag ttgcaacat tatcaccgcc	30
15	<210> 102 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
20	<400> 102 cagaatcagc attttctgtt gggccattgc	30
	<210> 103 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 103 aatccaacgc aggcaacat tatcaccgcc	30
30	<210> 104 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 104 gatgttttc attttctgtt gggccattgc	30
	<210> 105 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 105 taatttacta gtaggctga agcgcaaat gatcc	35
45	<210> 106 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	

	<400> 106 aattaaacta gttaacaccg tgcgtgtga	30
5	<210> 107 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> AATTAAGCTA GCTATAAACG CAGAAAGGCC CA	
10	<400> 107 aattaagcta gctataaacg cagaaaggcc ca	32
	<210> 108 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 108 atccaacgca ggcaaccatt atcacgcc	29
20	<210> 109 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 109 tccaacgcag gcaaccatta tcaccgcc	28
30	<210> 110 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 110 aattattaat taaacaattc tcaaaatcag aagagtattg cta	43
	<210> 111 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 111 aattactcga gcagcatctg atcgctgaag g	31
45	<210> 112 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
50	<400> 112 aattattaat taataattgt tctttttca ggtgaagggt ccc	43

	<210> 113		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 113		
	aattactcga gaccgcgtaa atcaatgcct ctt	34	
10	<210> 114		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 114		
	aattattaat taactctttt aatctttcaa ggagcaaaga	40	
	<210> 115		
	<211> 32		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 115		
	aattactcga gacgctggta gatctctca cg	32	
25	<210> 116		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> cebador		
	<400> 116		
	aattattaat taaataagat ggggtgtctg gggtaat	37	
	<210> 117		
	<211> 31		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 117		
40	aattactcga gatcattgcc agcgcgtgaa g	31	
	<210> 118		
	<211> 90		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 118		
	gagctcttgg tgcaaaacct ttcgcggtat ggcatgatag cgccaagcac atatcgaaag	60	
	gatagtcttg ataaccataa gtttaattaa	90	

ES 2 709 105 T3

	<210> 119		
	<211> 89		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 119		
	ttaattaaac ttatggttat caagactatc ctttcgatat gtgcttggcg ctatcatgcc	60	
	ataccgcgaa aggttttgca ccagagctc	89	
10	<210> 120		
	<211> 48		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 120		
	ttaattaaag gagaaagatt atgagaaact atcctgcaga acctata	48	
	<210> 121		
	<211> 53		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 121		
	gaattcttaa tggatgatgat ggtgatgcgc ttacgcttc ggtcaaaac gcg	53	
25	<210> 122		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> cebador		
	<400> 122		
	cattaactag ttggtgcaaa accttcgcg	30	
	<210> 123		
	<211> 30		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 123		
40	aaagcaaaac tcgcaacat taccaccgcc	30	
	<210> 124		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 124		
	tgtatcagcc atttctgtt gggccattgc attg	34	

	<210> 125 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 125 acaggccacc atgcaaccat tatcaccgcc	30
10	<210> 126 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
15	<400> 126 ttacgcgtca ttttctgtg ggccattgca ttg	33
20	<210> 127 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 127 aatttgcgcg acgcaaccat tatcaccgcc	30
25	<210> 128 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 128 acgatctgcc acttctgtt gggccattgc attg	34
35	<210> 129 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
40	<400> 129 aacccttagc cagcaaccat tatcaccgcc	30
45	<210> 130 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 130 acgctaataca ttttctgtg ggccattgca ttg	33
50	<210> 131 <211> 30 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 131 aagttcgcg gtgcaaccat taccacgcc	30
	<210> 132	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 132 caacactcgc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 133	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 133 tatgccccgg ctgcaaccat taccacgcc	30
	<210> 134	
	<211> 34	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 134 aactttaacc atttctgtt gggccattgc attg	34
30	<210> 135	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador	
	<400> 135 aatctgaaag atgcaaccat taccacgcc	30
	<210> 136	
	<211> 34	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 136 gtagagtttc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 137	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

ES 2 709 105 T3

	<223> cebador		
	<400> 137		
	agcaccacca ttgcaaccat tatcaccgcc	30	
5	<210> 138		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
10	<400> 138		
	aatgcgtttc attttctgtt gggccattgc attg	34	
	<210> 139		
	<211> 227		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> SgrS		
	<400> 139		
	gatgaagcaa ggggggtgcc catgcgtcag ttttatcagc actattttac cgcgacagcg	60	
	aagtttgtct ggttgcgttg gttaagcgtc ccacaacgat taaccatgct tgaaggactg	120	
	atgcagtggg atgaccgcaa ttctgaaagt tgacttgcct gcatcatgtg tgactgagta	180	
	ttggtgtaaa atcaccgcgc agcagattat acctgctggt ttttttt	227	
20	<210> 140		
	<211> 115		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> MicC		
	<400> 140		
	gttatatgcc tttattgtca cagattttat tttctgttgg gccattgcat tgccactgat	60	
	tttccaacat ataaaaagac aagcccgaac agtcgtccgg gctttttttc tcgag	115	
	<210> 141		
	<211> 93		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> MicF		
	<400> 141		
	gctatcatca ttaactttat ttattaccgt cattcatttc tgaatgtctg tttacccta	60	
35	tttcaaccgg atgcctcgca ttcggttttt ttt	93	
	<210> 142		
	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Fragmento de ARNm de DsRed2		

	<400> 142		
	ttattaatta aaggaggaca aatatatggc gagcagtgcg aacgtcatca ccgagttcat	60	
		60	
5	<210> 143 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Anti-DsRed2		
10	<400> 143 atgacgttct cactgctgc catatatttg tcctcctt	38	
	<210> 144 <211> 86 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Fragmento de ARNm de DsRed2		
	<400> 144 aaggaggaca aatatatggc gagcagtgcg aacgtcatca ccgagttcat gcgcttcaag	60	
	gtgcgcatgg agggcaccgt gaacgg	86	
20	<210> 145 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Fragmento de ARNm de DsRed2		
25	<400> 145 ccgacatccc cgactacaag aagctgct	28	
30	<210> 146 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> región A de emparejamiento de bases		
	<400> 146 atgacgttct cactgctgc catatatttg tcctcctt	38	
35	<210> 147 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> región B1 de emparejamiento de bases		
	<400> 147 atgacgttct cactgctgc catatatttg tc	32	
45	<210> 148 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> región B2 de emparejamiento de bases		
	<400> 148		
	tcggtgatga cgttctcact gctcgccata tattgtc	38	
5	<210> 149		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> región C1 de emparejamiento de bases		
	<400> 149		
	atgacgttct cactgctcgc	20	
	<210> 150		
	<211> 38		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> región C2 de emparejamiento de bases		
20	<400> 150		
	aagcgcata actcggatgac gacgttctca ctgctcgc	38	
	<210> 151		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> región D1 de emparejamiento de bases		
	<400> 151		
	aactcggatga tgacgttct	19	
	<210> 152		
30	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> región D2 de emparejamiento de bases		
35	<400> 152		
	cgcacattga agcgcataaa ctcggatgac acgttct	37	
	<210> 153		
	<211> 19		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> región E1 de emparejamiento de bases		
	<400> 153		
	aagcgcata actcggatga	19	
45	<210> 154		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> región E2 de emparejamiento de bases		

	<400> 154 ccctccatgc gcaccttgaa gcgcatgaac tcggtga	37
5	<210> 155 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> GCGCACCTTGAAGCGCATG	
10	<400> 155 gcgcaccttg aagcgcgatg	19
	<210> 156 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> región F2 de emparejamiento de bases	
	<400> 156 gttcacggtg ccctccatgc gcaccttgaa gcgcatg	37
20	<210> 157 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> región G1 de emparejamiento de bases	
25	<400> 157 gcttcttgta gtcgggggatg tcgg	24
	<210> 158 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> región G2 de emparejamiento de bases	
	<400> 158 gacagcttct tgtagtcggg gat	23
35	<210> 159 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNm de AraC	
	<400> 159 ttaattaaaa ggagaaaaac ggatggctga agcgcaaaat gatcccctgc tgccg	55
45	<210> 160 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Anti-AraC	
50	<400> 160 gatcattttg cgcttcagcc atccgttttt ctcctt	36

	<210> 161		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> ARNm de LuxR		
	<400> 161		
	ttaattaaaa ggagcaatca aaatgaacat caagaacatc aacgcgaacg agaag		55
10	<210> 162		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Anti-LuxR		
15	<400> 162		
	cgttgatgtt cttgatgttc atttgattg ctcctt	36	
	<210> 163		
	<211> 55		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ARNm de KanR		
	<400> 163		
	ttttaattaa ggagtcgttt acatgattga acaagatgga ttgcacgcag gtctt		55
25	<210> 164		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Anti-KanR		
	<400> 164		
	gcaatccatc ttgtcaatc atgtaaacga ctcctt	36	
	<210> 165		
	<211> 24		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ARNm de pgi		
	<400> 165		
40	atgaaaaaca tcaatccaac gcag	24	
	<210> 166		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> ARNs (anti-pgi)		
	<400> 166		
	ctgcgttga ttgatgttt tcat	24	
50	<210> 167		
	<211> 23		
	<212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNs (anti-pgi-D1)	
5	<400> 167 ctgcgttgga tgatgtttt cat	23
	<210> 168	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> ARNs (anti-pgi-D2)	
	<400> 168 ctgcgttgga gatgttttc at	22
	<210> 169	
15	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Variantes de anti-dsRed2	
20	<220>	
	<221 > misc_feature	
	<222> (1)..(16)	
	<223> A, T, C o G	
25	<400> 169 nnnnnnnnnn nnnnnngcaa ccattatcac cgcca	35
	<210> 170	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Variantes de anti-dsRed2	
	<220>	
	<221 > misc-feature	
35	<222> (1)..(16)	
	<223> A, T, C o G	
	<400> 170 nnnnnnnnnn nnnnnngcaa ccattatcac cgcca	35
	<210> 171	
40	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
45	<400> 171 atgatgaac cattatcacc gccagaggta aaa	33
	<210> 172	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	

	<400> 172 ggtcattttc tgttgggcca ttgcattgcc ac	32
5	<210> 173 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador directo de anti-LacZ	
10	<400> 173 atgattgcaa ccattatcac cgccagaggt aaaa	34
	<210> 174 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 174 ggtcattttc tgttgggcca ttgcattgcc ac	32
20	<210> 175 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-LacZ	
25	<400> 175 tgattagcaa ccattatcac cgccagaggt aaaa	34
	<210> 176 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 176 tggtcatttt ctgttgggcc attgcattgc cac	33
35	<210> 177 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 177 tgattacgca accattatca ccgccagagg taaaa	35
45	<210> 178 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-LacZ	
50	<400> 178 tggtcatttt ctgttgggcc attgcattgc cac	33

	<210> 179	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 179	
	gattacggca accattatca ccgccagagg taaaa	35
10	<210> 180	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
15	<400> 180	
	atggtcattt tctgtgggc cattgcattg ccac	34
	<210> 181	
	<211> 36	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 181	
	gattacgggc aaccattatc accgccagag gtaaaa	36
25	<210> 182	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 182	
	atggtcattt tctgtgggc cattgcattg ccac	34
	<210> 183	
	<211> 36	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 183	
40	attacggagc aaccattatc accgccagag gtaaaa	36
	<210> 184	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 184	
	catggtcatt ttctgtggg ccattgcatt gccac	35
	<210> 185	
50	<211> 37	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
5	<400> 185 ttacggattg caaccattat caccgccaga ggtaaaa	37
	<210> 186	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 186 tcattgtcat ttctgttg gccattgat tgccac	36
	<210> 187	
15	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
20	<400> 187 ttacggattc gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa	38
	<210> 188	
	<211> 36	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 188 tcattgtcat ttctgttg gccattgat tgccac	36
30	<210> 189	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 189 tacggattca gcaaccatta tcaccgccag aggtaaaa	38
	<210> 190	
	<211> 37	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
45	<400> 190 atcatgttca ttctgttg ggccattgca ttgccac	37
	<210> 191	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 191	
	tacggattca cgcaaccatt atcaccgcca gaggtaaaa	39
5	<210> 192	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
10	<400> 192	
	atcatggtca ttttctgtg ggccattgca ttgccac	37
	<210> 193	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 193	
	acggattcac tggcaaccat tatcaccgcc agaggtaaaa	40
20	<210> 194	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 194	
	aatcatggtc attttctgt gggccattgc attgccac	38
	<210> 195	
30	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-LacZ	
	<400> 195	
35	ggattcactg gccggcaacc attatcacg ccagaggtaa aa	42
	<210> 196	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-LacZ	
	<400> 196	
	gtaatcatgg tcatttctg ttgggccatt gcattgccac	40
	<210> 197	
45	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Rmo	
50	<400> 197	

	aattaaagat cttaacaccg tgcgtgtga	30
	<210> 198	
	<211> 26	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Rmo	
	<400> 198	
10	gagctctata aacgcagaaa ggccca	26
	<210> 199	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador Rmo	
	<400> 199	
	actagttaac accgtgcgtg ttga	24
	<210> 200	
20	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Rmo	
	<400> 200	
25	ggatcctata aacgcagaaa ggccca	26
	<210> 201	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador Rmo	
	<400> 201	
	gcatgctaac accgtgcgtg ttga	24
	<210> 202	
35	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Rmo	
40	<400> 202	
	gtcgactata aacgcagaaa ggccca	26
	<210> 203	
	<211> 28	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
	<400> 203	
	ttctcgtcg gcaaccatta tcaccgcc	28
50	<210> 204	

	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
	<400> 204	
	gaatcagcat tttctgttg gccattgc	28
	<210> 205	
10	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
15	<400> 205	
	gactcgtcga ggcaaccatt atcaccgcc	29
	<210> 206	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
	<400> 206	
	agaatcagca tttctgttg ggccattgc	29
	<210> 207	
25	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
30	<400> 207	
	taactcgtcg gcaaccatta tcaccgc	27
	<210> 208	
	<211> 28	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
	<400> 208	
	gaatcagcat tttctgttg gccattgc	28
40	<210> 209	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador pWAS-anti-csrA	
	<400> 209	
	tcgtcgagtt ggtgggcaac cattatcacc gcc	33
	<210> 210	
50	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		
	<400> 210		
	tcagaatcag cattttctgt tgggccattg c	31	
5	<210> 211		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		
	<400> 211		
	ccgtcgagtt ggtgggcaac cattatcacc gcc	33	
	<210> 212		
	<211> 31		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		
20	<400> 212		
	tcagaatcag cattttctgt tgggccattg c	31	
	<210> 213		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		
	<400> 213		
	agtcgagttg gtgaggcaac cattatcacc gcc	33	
	<210> 214		
30	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		
35	<400> 214		
	cgtcagaatc agcattttct gttgggccat tgc	33	
	<210> 215		
	<211> 33		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		
	<400> 215		
	gtcgagttgg tgagggaac cattatcacc gcc	33	
45	<210> 216		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> cebador pWAS-anti-csrA		

	<400> 216 agtcagaatc agcattttct gttgggcat tgc	33
5	<210> 217 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador pWAS-anti-csrA	
10	<400> 217 tcgagttggt gagggcaacc attatcaccg cc	32
	<210> 218 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador pWAS-anti-csrA	
	<400> 218 cggtcagaat cagcattttc tgtgggcca ttgc	34
20	<210> 219 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-accA	
25	<400> 219 ttccttgatt ttgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 220 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador inverso de anti-accA	
	<400> 220 attcagactc atttctggt gggccattgc attg	34
35	<210> 221 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador directo de anti-accB	
	<400> 221 aagattaaaa aagcaaccat tatcaccgcc	30
45	<210> 222 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-accB	
50	<400> 222 acgaatatcc atttctggt gggccattgc attg	34

	<210> 223	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador directo de anti-accC	
	<400> 223	
	attgttattg ccgcaacat tatcaccgcc	30
10	<210> 224	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-accC	
15	<400> 224	
	tttatccagc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 225	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-accD	
	<400> 225	
	gaacgaatta aagcaacat tatcaccgcc	30
25	<210> 226	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador inverso de anti-accD	
	<400> 226	
	aatccagctc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 227	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-accE	
	<400> 227	
40	ttcccaaag acgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 228	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-accE	
	<400> 228	
	acgttctgac attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 229	
50	<211> 30	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-accF	
5	<400> 229 atcaaagtac cggcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 230	
	<211> 34	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-accF	
	<400> 230 ttcgatagcc atttctggtt gggccattgc attg	34
15	<210> 231	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador directo de anti-ackA	
	<400> 231 gcaacggttag tcgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 232	
	<211> 38	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ackA	
	<400> 232 tccccggaac attcattttc tgttgggcca ttgcattg	38
	<210> 233	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador directo de anti-adiY	
	<400> 233 agcgaccaac ctgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 234	
	<211> 34	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-adiY	
45	<400> 234 gcaaatcctc atttctggtt gggccattgc attg	34
	<210> 235	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> cebador directo de anti-argB	
	<400> 235 attatcaaac tggcaaccat tatcaccgcc	30
5	<210> 236 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador inverso de anti-argB	
	<400> 236 taatggattc attttctgtt gggccattgc attg	34
15	<210> 237 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-argC	
20	<400> 237 ctgattgtgg gtgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 238 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador inverso de anti-argC	
	<400> 238 cgtattcaac attttctgtt gggccattgc attg	34
30	<210> 239 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-argG	
35	<400> 239 ctcaagcatc tcgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 240 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-argG	
	<400> 240 aatcgtcgtc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 241 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador directo de anti-argH	

	<400> 241 ggcgggcggtt ttgcaaccat tatcaccgcc	30
5	<210> 242 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-argH	
10	<400> 242 ccaaagtgcc attttctggt gggccattgc attg	34
	<210> 243 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de anti-asnC	
	<400> 243 ctgatcgaca atgcaaccat tatcaccgcc	30
20	<210> 244 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-asnC	
25	<400> 244 ataattttcc attttctggt gggccattgc attg	34
	<210> 245 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de anti-aspA	
	<400> 245 attcgtatcg aagcaaccat tatcaccgcc	30
35	<210> 246 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-aspA	
	<400> 246 gttgtttgac attttctggt gggccattgc attg	34
45	<210> 247 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-crp	
50	<400> 247 aaaccgcaaa cagcaaccat tatcaccgcc	30

	<210> 248	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-crp	
	<400> 248	
	gccaaagcacc attttctgtt gggccattgc attg	34
10	<210> 249	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-csiD	
15	<400> 249	
	accgccgtac aagcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 250	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-csiD	
	<400> 250	
	cagtgcattc attttctgtt gggccattgc attg	34
25	<210> 251	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador directo de anti-csiR	
	<400> 251	
	tctctggatg gcgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 252	
	<211> 34	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-csiR	
	<400> 252	
40	cgtaatggtc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 253	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo de anti-cytR	
	<400> 253	
	aagcaggaaa ctgcaacat tatcaccgcc	30
50	<210> 254	
	<211> 34	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-cytR	
5	<400> 254 cttcgcttc actttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 255	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador directo de anti-dcuA	
	<400> 255 gaactcatca tagcaacccat taccacgcc	30
	<210> 256	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-dcuA	
20	<400> 256 tacaactagc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 257	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-deoB	
	<400> 257 tttattatgg tggcaacccat taccacgcc	30
30	<210> 258	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de anti-deoB	
	<400> 258 tgcacgttc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 259	
	<211> 30	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-deoC	
45	<400> 259 aaagcaagca gcgcaacccat taccacgcc	30
	<210> 260	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador inverso de anti-deoC	
	<400> 260	
	cagatcagtc atttctgtt gggccattgc attg	34
5	<210> 261	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-deoR	
10	<400> 261	
	cgccaagagc gtgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 262	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-deoR	
	<400> 262	
	acgtgtttcc atttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 263	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo de anti-fabH	
	<400> 263	
	taatggagct gtcattttct gttgggccat tgcattg	37
	<210> 264	
	<211> 36	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-fabH	
	<400> 264	
35	accctattga tcgtgcaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 265	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador directo de anti-fadD	
	<400> 265	
	tggttaacc gtgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 266	
45	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-fadD	
50	<400> 266	

	aacctcttc aatttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 267	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-fadR	
	<400> 267	
	gcgcaaagcc cggaacat tatcaccgcc	30
10	<210> 268	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador inverso de anti-fadR	
	<400> 268	
	cttaatgacc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 269	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-fbp	
	<400> 269	
25	ggtgaattta ttgaacat tatcaccgcc	30
	<210> 270	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-fbp	
	<400> 270	
	taacgttttc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 271	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-fnr	
40	<400> 271	
	aagcgaatta tagcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 272	
	<211> 34	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-fnr	
	<400> 272	
	ttccgggatc atttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 273	

	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador directo de anti-fruR	
	<400> 273	
	gaaatcgctc gggcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 274	
10	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-fruR	
	<400> 274	
15	atccagtttc actttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 275	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ftsL	
	<400> 275	
	gtgacagaag ctgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 276	
25	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ftsL	
	<400> 276	
30	tctgctgatc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 277	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ftsQ	
	<400> 277	
	gctctgaaca cggcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 278	
40	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador inverso de anti-ftsQ	
	<400> 278	
	agcctgcgac attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 279	
	<211> 30	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> cebador directo de anti-ftsW		
	<400> 279		
	ctccctcgcc tggcaaccat tatcaccgcc	30	
5	<210> 280		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador inverso de anti-ftsW		
	<400> 280		
	agataaacgc attttctgtt gggccattgc attg	34	
	<210> 281		
	<211> 30		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador directo de anti-ftsZ		
20	<400> 281		
	atggaactta ccgcaaccat tatcaccgcc	30	
	<210> 282		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador inverso de anti-ftsZ		
	<400> 282		
	tgggtcaaac attttctgtt gggccattgc attg	34	
	<210> 283		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador directo de anti-fur		
35	<400> 283		
	aataccgccc tagcaaccat tatcaccgcc	30	
	<210> 284		
	<211> 34		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador inverso de anti-fur		
	<400> 284		
	gttatcagtc attttctgtt gggccattgc attg	34	
45	<210> 285		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> cebador directo de anti-gabD		

	<400> 285 gacagtaact tagcaaccat tatcaccgcc	30
5	<210> 286 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-gabD	
10	<400> 286 gttaagtctc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 287 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de anti-gabP	
	<400> 287 tcgcaaccac atgcaaccat tatcaccgcc	30
20	<210> 288 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-gabP	
25	<400> 288 tgattgcccc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 289 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de anti-gabT	
	<400> 289 aaagagttaa tggcaaccat tatcaccgcc	30
35	<210> 290 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-gabT	
	<400> 290 attgctgttc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 291 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador directo de anti-gadA	
50	<400> 291 ctgttaacgg atgcaaccat tatcaccgcc	30

	<210> 292	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-gadA	
	<400> 292	
	cttctggtcc atttctgtt gggccattgc attg	34
10	<210> 293	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-gadB	
15	<400> 293	
	caagtaacgg atgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 294	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-gadB	
	<400> 294	
	cttcttatcc atttctgtt gggccattgc attg	34
25	<210> 295	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador directo de anti-gadC	
	<400> 295	
	gtacagacag gtgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 296	
	<211> 34	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-gadC	
	<400> 296	
40	tgatgtagcc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 297	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo de anti-glcC	
	<400> 297	
	acgttcatct ttcattttct gttgggcat tgcattg	37
50	<210> 298	
	<211> 36	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-glcC	
5	<400> 298 cgccctattt gcgaagcaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 299	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador directo de anti-glpK	
	<400> 299 aaatatatcg ttgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 300	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-glpK	
20	<400> 300 ttttcagtc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 301	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-glpR	
	<400> 301 caacgtcaca acgcaaccat tatcaccgcc	30
30	<210> 302	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de anti-glpR	
	<400> 302 tgtttgttc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 303	
	<211> 30	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-glpX	
	<400> 303 cttgccatcg aagcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 304	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador inverso de anti-glpX	
	<400> 304	
	ttctcgtctc attttctgtt gggccattgc attg	34
5	<210> 305	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-gltA	
10	<400> 305	
	aaagcaaaac tcgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 306	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-gltA	
	<400> 306	
	tgtatcagcc attttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 307	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo de anti-hfld	
	<400> 307	
	tactatgaca tcgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 308	
	<211> 34	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-hfld	
	<400> 308	
35	attctttgcc actttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 309	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ihfa	
	<400> 309	
	ttttgtaagc gccattttct gttgggccat tgcattg	37
	<210> 310	
45	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ihfa	
50	<400> 310	

	gctgaaatgt cagaagcaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 311	
	<211> 37	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ihfb	
	<400> 311	
	ttctgacttg gtcattttct gttgggcat tgcattg	37
10	<210> 312	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador inverso de anti-ihfb	
	<400> 312	
	ttgatagaaa gacttgcaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 313	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvB	
	<400> 313	
25	ggcacaacat cggcaacat tatcacgcc	30
	<210> 314	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ilvB	
	<400> 314	
	cgaactgcc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 315	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvC	
40	<400> 315	
	ttcaatacac tggcaacat tatcacgcc	30
	<210> 316	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ilvC	
	<400> 316	
	gtagttagcc attttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 317	

	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador directo de anti-ilvD	
	<400> 317 cgttccgccca ccgcaaccat tatcaccgcc	30
10	<210> 318 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-ilvD	
15	<400> 318 gtactaggc atttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 319 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-ilvG_ 1	
25	<400> 319 cacagtgggt gggcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 320 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-ilvG_ 1	
30	<400> 320 cgccattcat ttctgttg gccattgcat tg	32
35	<210> 321 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-ilvG_ 2	
40	<400> 321 aacaactgtc gggcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 322 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador inverso de anti-ilvG_ 2	
	<400> 322 ttaacaacaa ttctgttg gccattgcat tg	32
50	<210> 323 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvH	
	<400> 323	
	ttatcagtct tagcaacat tatcaccgcc	30
5	<210> 324	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ilvH	
	<400> 324	
	tatccggcgc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 325	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvL	
20	<400> 325	
	ctacgagtga ttgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 326	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ilvL	
	<400> 326	
	aagggtgtc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 327	
30	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvM	
35	<400> 327	
	caggtcaatg tagcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 328	
	<211> 34	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ilvM	
	<400> 328	
	atgttgcac attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 329	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvN	

	<400> 329 actcatgaca acgcaaccat tatcaccgcc	30
5	<210> 330 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-ilvN	
10	<400> 330 tgtgtttgc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 331 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de anti-ilvX	
	<400> 331 acaaaattct gtgcaaccat tatcaccgcc	30
20	<210> 332 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-ilvX	
25	<400> 332 gctgttattc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 333 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de anti-lexA	
	<400> 333 acggccaggc aagcaaccat tatcaccgcc	30
35	<210> 334 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-lexA	
	<400> 334 taacgctttc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 335 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador directo de anti-lpxC	
50	<400> 335 aggacactta aagcaaccat tatcaccgcc	30

	<210> 336	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-lpxC	
	<400> 336	
	ttgtttgatc attttctgtt gggccattgc attg	34
10	<210> 337	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-marA	
15	<400> 337	
	gcaacgtag tcgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 338	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-marA	
	<400> 338	
	tccccggaac attttctgtt gggccattgc attg	34
25	<210> 339	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador directo de anti-metJ	
	<400> 339	
	agcggcgaat atgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 340	
	<211> 34	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-metJ	
	<400> 340	
40	ccattcagcc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 341	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo de anti-modE	
	<400> 341	
	atccttctca ccgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 342	
50	<211> 34	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-modE	
5	<400> 342 ttcggcctgc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 343	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador directo de anti-nadB	
	<400> 343 cctgaacatt cagcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 344	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-nadB	
20	<400> 344 gagagtattc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 345	
	<211> 36	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-nagC	
	<400> 345 ccgcctggtg tcattttctg ttgggccatt gcattg	36
30	<210> 346	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de anti-nagC	
	<400> 346 acaagctcag atagggaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 347	
40	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-narL	
45	<400> 347 gaaccggcta ctgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 348	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador inverso de anti-narL	
	<400> 348	
	ctgattactc attttctgtt gggccattgc attg	34
5	<210> 349	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-pck	
10	<400> 349	
	aatggtttga ccgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 350	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-pck	
	<400> 350	
	gttaacgcgc attttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 351	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo de anti-PdhR	
	<400> 351	
	aaaatccgcc aagcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 352	
	<211> 34	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-PdhR	
	<400> 352	
35	gctgtaggcc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 353	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador directo de anti-phoP	
	<400> 353	
	gttggtgaag acgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 354	
45	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-phoP	
50	<400> 354	

	cagtacgcgc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 355	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-pnuC	
	<400> 355	
10	agtgatgcaga atgcaacccat tatcaccgcc	30
	<210> 356	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador inverso de anti-pnuC	
	<400> 356	
	aaaaaaatcc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 357	
20	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ppsA	
	<400> 357	
25	ggctcgtcac cggcaacccat tatcaccgcc	30
	<210> 358	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-ppsA	
	<400> 358	
	attgttgac attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 359	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-purA	
40	<400> 359	
	gtcgtgtac tggcaacccat tatcaccgcc	30
	<210> 360	
	<211> 34	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-purA	
	<400> 360	
	gttgttacc attttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 361	

	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador directo de anti-purB	
	<400> 361	
	tcactgaccg cgcgaacccat tatcaccgcc	30
10	<210> 362	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-purB	
15	<400> 362	
	ggataattcc attttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 363	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-purR	
	<400> 363	
	aaagatgtag cgcgaacccat tatcaccgcc	30
25	<210> 364	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-purR	
30	<400> 364	
	tattgttgcc attttctgtt gggccattgc attg	34
35	<210> 365	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-puuE	
	<400> 365	
	gaattccatc aggcgaacccat tatcaccgcc	30
40	<210> 366	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-puuE	
	<400> 366	
	attgttgctc attttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 367	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> cebador directo de anti-rbsA		
	<400> 367		
	cttcagctta aagcaaccat tatcaccgcc	30	
5	<210> 368		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador inverso de anti-rbsA		
	<400> 368		
	taatgcttc attttctgtt gggccattgc attg	34	
	<210> 369		
	<211> 30		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador directo de anti-rbsB		
20	<400> 369		
	aaactggcta ccgcaaccat tatcaccgcc	30	
	<210> 370		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador inverso de anti-rbsB		
	<400> 370		
	tttcattgtc attttctgtt gggccattgc attg	34	
	<210> 371		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador directo de anti-rbsD		
35	<400> 371		
	accgttctta atgcaaccat tatcaccgcc	30	
	<210> 372		
	<211> 34		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador inverso de anti-rbsD		
	<400> 372		
	gccttttttc attttctgtt gggccattgc attg	34	
45	<210> 373		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> cebador directo de anti-rbsK		

	<400> 373 ggcagcctcg ttgcaaccat tatcaccgcc	30
5	<210> 374 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-rbsK	
10	<400> 374 tgcgttttgc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 375 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de anti-rbsR	
	<400> 375 aaagatgttg ccgcaaccat tatcaccgcc	30
20	<210> 376 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-rbsR	
25	<400> 376 cattgtagcc aatttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 377 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de anti-rbsB	
	<400> 377 aacgtaatta ttgcaaccat tatcaccgcc	30
35	<210> 378 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-rbsB	
	<400> 378 catattgttc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 379 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-rutR	
50	<400> 379 gcagtgaata cagcaaccat tatcaccgcc	30

	<210> 380	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-rutR	
	<400> 380	
	gccttgcgtc attttctgtt gggccattgc attg	34
10	<210> 381	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-serA	
15	<400> 381	
	tcgctggaga aagcaaccat tatcaccgc	29
	<210> 382	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-serA	
	<400> 382	
	tacctttgcc attttctgtt gggccattgc attg	34
25	<210> 383	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador directo de anti-serC	
	<400> 383	
	ttcaatttta gtgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 384	
	<211> 34	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-serC	
	<400> 384	
40	gatttgagcc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 385	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo de anti-soxS	
	<400> 385	
	aaaattattc aggcaaccat tatcaccgcc	30
50	<210> 386	
	<211> 34	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-soxS	
5	<400> 386 ctgatgggac atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 387	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador directo de anti-sroD	
	<400> 387 gcgcgcgga aagcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 388	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-sroD	
20	<400> 388 ttcgtcacgt aatttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 389	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-zwf	
	<400> 389 caaacagccc aggcaaccat tatcaccgcc	30
30	<210> 390	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de anti-zwf	
	<400> 390 cgttaccgcc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 391	
	<211> 30	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-asnA	
45	<400> 391 tacattgcca aagcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 392	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador inverso de anti-asnA	
	<400> 392	
	agcggttttc attttctgtt gggccattgc attg	34
5	<210> 393	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-asnB	
10	<400> 393	
	tttggcgtat tcgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 394	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-asnB	
	<400> 394	
	aattgaacac attttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 395	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo de anti-carA	
	<400> 395	
	gcgctattgg ttgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 396	
	<211> 34	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-carA	
	<400> 396	
35	tgacttaatc aatttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 397	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador directo de anti-carB	
	<400> 397	
	acagatataa aagcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 398	
45	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-carB	
50	<400> 398	

	acgttttggc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 399	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ddIB	
	<400> 399	
	atcgcggtcc tggcaaccat tatcaccgcc	30
10	<210> 400	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador inverso de anti-ddIB	
	<400> 400	
	tttatcagtc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 401	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-deoA	
	<400> 401	
25	caagaaatta ttgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 402	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-deoA	
	<400> 402	
	tgcgagaaac aatttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 403	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-deoD	
40	<400> 403	
	cacattaatg cagcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 404	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-deoD	
	<400> 404	
	tgggtagcc attttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 405	

	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador directo de anti-dpiA	
	<400> 405	
	taatggagct gtcattttct gttgggcat tgcatg	37
	<210> 406	
10	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-dpiA	
	<400> 406	
15	accctattga tcgtgcaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 407	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador directo de anti-fis	
	<400> 407	
	cgcgtaaatt ctgcaacat tatcacgcc	30
	<210> 408	
25	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-fis	
	<400> 408	
30	ttgttcgaac attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 409	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-gadE	
	<400> 409	
	atgacgaaag atgcaacat tatcacgcc	30
40	<210> 410	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador inverso de anti-gadE	
	<400> 410	
	gagaaaaatc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 411	
	<211> 30	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> cebador directo de anti-gadW	
	<400> 411	
	tgctcgggtga tcgcaacccat tatcaccgcc	30
5	<210> 412	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-gadW	
	<400> 412	
	gacatgagtc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 413	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-gadX	
20	<400> 413	
	catgggaatt gtgcaacccat tatcaccgcc	30
	<210> 414	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-gadX	
	<400> 414	
	tagtgattgc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 415	
30	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-glpF	
35	<400> 415	
	tcaaccttga aagcaacccat tatcaccgcc	30
	<210> 416	
	<211> 34	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-glpF	
	<400> 416	
	tgtttgactc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 417	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ilvY	

	<400> 417 gatctgaaaa ccgcaaccat tatcaccgcc	30
5	<210> 418 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-ilvY	
10	<400> 418 gcgtaaatcc actttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 419 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de anti-ilvBL	
	<400> 419 atgctcaacg cagcaaccat tatcaccgcc	30
20	<210> 420 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-ilvBL	
25	<400> 420 ggaagtagtc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 421 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de anti-IhgO	
	<400> 421 gtgattattg gcgcaaccat tatcaccgcc	30
35	<210> 422 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-IhgO	
	<400> 422 aaaatcatatc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 423 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-Ipd	
50	<400> 423 atcaaaactc aggcaaccat tatcaccgcc	30

	<210> 424	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-lpd	
	<400> 424	
	ttcagtactc attttctgtt gggccattgc attg	34
10	<210> 425	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-lrp	
15	<400> 425	
	aagaagcgcc ctgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 426	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-lrp	
	<400> 426	
	gctatctacc attttctgtt gggccattgc attg	34
25	<210> 427	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador directo de anti-metB	
	<400> 427	
	acagggcacc atgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 428	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-metB	
	<400> 428	
40	ttacgcgtca ttttctgttg ggccattgca ttg	33
	<210> 429	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo de anti-metL	
	<400> 429	
	gcgcaggcag gggcaaccat tatcaccgcc	30
50	<210> 430	
	<211> 34	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-metL	
5	<400> 430 aatcacactc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 431	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador directo de anti-mraY	
	<400> 431 ctggccgaac atgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 432	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-mraY	
20	<400> 432 ccaaactaac atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 433	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-mraZ	
	<400> 433 gcaacgttag tcgcaaccat tatcaccgcc	30
30	<210> 434	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de anti-mraZ	
	<400> 434 tccccggaac atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 435	
	<211> 30	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murE	
	<400> 435 aatttgcgcg acgcaaccat tatcaccgcc	30
45	<210> 436	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 436	
	acgatctgcc acttctgtt gggccattgc attg	34
5	<210> 437	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murF	
10	<400> 437	
	aacccttagc cagcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 438	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murF	
	<400> 438	
	acgctaataca tttctgttg ggccattgca ttg	33
20	<210> 439	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo de anti-murG	
	<400> 439	
	ggaaagcgat tagcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 440	
	<211> 34	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murG	
	<400> 440	
35	ttgaccactc atttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 441	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador directo de anti-nac	
	<400> 441	
	cgcctgaaat acgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 442	
45	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-nac	
50	<400> 442	

	tctgaagttc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 443	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-nadA	
	<400> 443	
	tttgatccag acgcaacccat tatcacccgcc	30
10	<210> 444	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador inverso de anti-nadA	
	<400> 444	
	cattacgctc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 445	
	<211> 37	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-nsrR	
	<400> 445	
25	actcggtaac tgcactttct gttgggccat tgcattg	37
	<210> 446	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador inverso de anti-nsrR	
	<400> 446	
	ttcactgatt acggagcaac cattatcacc gccaga	36
	<210> 447	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-panC	
40	<400> 447	
	gaaaccctgc cggcaacccat tatcacccgcc	30
	<210> 448	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-panC	
	<400> 448	
	gataattaac actttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 449	

	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador directo de anti-panD	
	<400> 449 atgctgcagg gcgcaaccat tatcaccgcc	30
10	<210> 450 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-panD	
15	<400> 450 cgtgcgaatc atttctgtt gggccattgc attg	34
20	<210> 451 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-pgl	
	<400> 451 gtttatatcg ccgcaaccat tatcaccgcc	30
25	<210> 452 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-pgl	
30	<400> 452 tgtttgcttc atttctgtt gggccattgc attg	34
35	<210> 453 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-pyrB	
	<400> 453 ctatatcaga aagcaaccat tatcaccgcc	30
40	<210> 454 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador inverso de anti-pyrB	
	<400> 454 cggattagcc atttctgtt gggccattgc attg	34
50	<210> 455 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> cebador directo de anti-pyrC	
	<400> 455	
	tcccaggtat tagcaacat tatcaccgcc	30
5	<210> 456	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-pyrC	
	<400> 456	
	tggtgcagtc atttctggt gggccattgc attg	34
	<210> 457	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-pyrl	
20	<400> 457	
	aataaattgc aggcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 458	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-pyrl	
	<400> 458	
	atcgtgtgtc atttctggt gggccattgc attg	34
	<210> 459	
30	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-rob	
35	<400> 459	
	ggcattattc gcgcaacat tatcaccgcc	30
	<210> 460	
	<211> 34	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-rob	
	<400> 460	
	ggcctgatcc atttctggt gggccattgc attg	34
45	<210> 461	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador directo de anti-rpe	

	<400> 461 ttgattgcc cgcgaacat tatcaccgcc	30
5	<210> 462 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador inverso de anti-rpe	
10	<400> 462 atactgttc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 463 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de anti-talA	
	<400> 463 gacggcatca aagcaacat tatcaccgcc	30
20	<210> 464 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de anti-talA	
25	<400> 464 taactcgttc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 465 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de anti-talB	
	<400> 465 ttgacctccc ttgcaacat tatcaccgcc	30
35	<210> 466 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador inverso de anti-talB	
	<400> 466 ttgtccgtc attttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 467 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador directo de anti-thrA	
50	<400> 467 aagttcggcg gtgcaacat tatcaccgcc	30

	<210> 468	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-thrA	
	<400> 468	
	caacactcgc atttctgtt gggccattgc attg	34
10	<210> 469	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-thrC	
15	<400> 469	
	aatctgaaag atgcaaccat tatcaccgcc	30
20	<210> 470	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-thrC	
	<400> 470	
	gtagagtttc atttctgtt gggccattgc attg	34
25	<210> 471	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador directo de anti-thrL	
	<400> 471	
	agcaccacca ttgcaaccat tatcaccgcc	30
35	<210> 472	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-thrL	
40	<400> 472	
	aatgcgttc atttctgtt gggccattgc attg	34
45	<210> 473	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-ktA	
	<400> 473	
	aaagagcttg ccgcaaccat tatcaccgcc	30
50	<210> 474	
	<211> 34	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti- <i>tktA</i>	
5	<400> 474 acgtgaggac attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 475	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador directo de anti- <i>tktB</i>	
	<400> 475 gaccttgcca atgcaaccat tatcaccgcc	30
	<210> 476	
15	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti- <i>tktB</i>	
20	<400> 476 ttttcgggac attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 477	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti- <i>torR</i>	
	<400> 477 attgttattg ttgcaaccat tatcaccgcc	30
30	<210> 478	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador inverso de anti- <i>torR</i>	
	<400> 478 gtgatgtggc attttctgtt gggccattgc attg	34
	<210> 479	
	<211> 24	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti- <i>murE</i>	
45	<400> 479 gatcgtgcaa ccattatcac cgcc	24
	<210> 480	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 480	
	tgccacttc tgttgggcca ttgcattg	28
5	<210> 481	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murE	
10	<400> 481	
	gtcgtaagca accattatca ccgcc	25
	<210> 482	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 482	
	ctgccacttt ctgttgggcc attgcattg	29
20	<210> 483	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo de anti-murE	
	<400> 483	
	tcgtaattgc aaccattatc accgcc	26
	<210> 484	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 484	
35	tctgccactt tctgttgggc cattgcattg	30
	<210> 485	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murE	
	<400> 485	
	taatttgcgc ggcaaccatt atcaccgcc	29
	<210> 486	
45	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murE	
50	<400> 486	

	cgatctgccca ctttctgttg ggccattgca ttg	33
	<210> 487	
	<211> 31	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murE	
	<400> 487	
	atttgcgcgga cctgcaacca ttatcaccgc c	31
10	<210> 488	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 488	
	tacgatctgc cactttctgt tgggccattg cattg	35
	<210> 489	
20	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murE	
	<400> 489	
25	ttgcgcgac cttcgcaacc attatcacgc cc	32
	<210> 490	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 490	
	ttacgatctg ccactttctg ttgggccatt gcattg	36
	<210> 491	
35	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de anti-murE	
	<400> 491	
40	ttgcgcgacc ttcttgcaac cattatcacc gcc	33
	<210> 492	
	<211> 37	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de anti-murE	
	<400> 492	
	attacgatct gccactttct gttgggccat tgcattg	37
50		

REIVINDICACIONES

1. Un ARNs para inhibir la expresión génica en procariotas, comprendiendo el ARNs:

- (i) un sitio de unión a Hfq del ARNs de MicC; y
- (ii) una región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana

5 en el que la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana se construye de forma que la energía de unión al ARNm del gen diana esté en el intervalo de -20 kcal/mol a -40 kcal/mol; y en el que la región que empareja sus bases con los pares de bases del ARNm del gen diana con parte del sitio de unión del ribosoma del ARN del gen diana y la región tiene una longitud de 19-37 nucleótidos.

10 2. El ARNs de la reivindicación 1, en el que un sitio que no se une al ARNm del gen diana se forma mediante inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos en la región que empareja sus bases con el ARNm del gen diana.

15 3. El ARNs de la reivindicación 1, en el que los procariotas se seleccionan del grupo que consiste en *E. coli*, *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*, y *Cyclobacterium*.

20 4. El ARNs de la reivindicación 1, en el que el ARNm del gen diana es un ARNm de un gen seleccionado del grupo que consiste en el gen de resistencia a la kanamicina, regulador de tirosina, fosfoenolpiruvato carboxilasa, regulador del almacenamiento de carbono, glucosa-6-fosfato isomerasa, citrato sintasa, acetil-CoA carboxiltransferasa, subunidad alfa, proteína biotinilada transportadora de biotina-carboxilo, acetil-CoA carboxilasa, acetil-CoA carboxiltransferasa, subunidad beta, piruvato deshidrogenasa, actividad de propionato cinasa / acetato cinasa, adiY, acetilglutamato cinasa, N-acetilglutamilfosfato reductasa, argininosuccinato sintasa, argininosuccinato liasa, aspartato amoniaco-liasa, fosfopentomutasa, desoxirribosa-fosfato aldolasa, KASIII, -cetoacil-ACP sintasas, acil-CoA sintetasa grasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, transportador de APC, 4-aminobutirato aminotransferasa, subunidad A de glutamato descarboxilasa, subunidad B de glutamato descarboxilasa, transportador de APC GABA, glicerol cinasa, represor de sn-Glicerol-3-fosfato, fructosa 1,6-bisfosfatasa II, citrato sintasa, regulador de lisogenización, acetohidroxiбутаноato sintasa / acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomeroreductasa, dihidroxiácido deshidratasa, acetolactato sintasa / acetohidroxiбутаноato sintasa, acetohidroxiбутаноato sintasa / acetolactato sintasa, UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina deacetilasa, L-aspartato oxidasa, regulador de respuesta de nitrato/nitrito, fosfoenolpiruvato carboxicinas, fosfoenolpiruvato sintetasa, fosfato acetiltransferasa, adenilosuccinato sintetasa, adenilosuccinato liasa, 4-aminobutirato aminotransferasa, transportador ABC de ribosa, ribosa piranasa, ribocinasa, alfa-cetoglutarato reductasa / D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, fosfohidroxitreonina aminotransferasa / 3-fosfoserina aminotransferasa, glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa, asparagina sintetasa A, carbamoil fosfato sintetasa, D-alanina-D-alanina ligasa B, timidina fosforilasa / uracil fosforilasa, L-2-hidroxi-glutarato oxidasa, Lipoamida deshidrogenasa, O-succinilhomoserina liasa / O-succinilhomoserina(tiol)-liasa, aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa, fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido transferasa, UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato 2,6-diaminopimelato ligasa, enzima de adición de D-alanil-D-alanina, N-acetilglucosaminil transferasa, quinolinato sintasa, pantotenato sintetasa, Aspartato 1-d Descarboxilasa, 6-fosfogluconolactonasa, dihidroorotasa, ribulosa fosfato 3-epimerasa, transaldolasa A, aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa, homoserina cinasa, treonina sintasa, transcetolasa I y transcetolasa II.

35 5. Un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el procedimiento las etapas de: introducir o expresar el ARNs de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un procariota; e inhibir la expresión del ARNm del gen diana.

45 6. Un procedimiento de selección de un gen que necesita ser delecionado para producir una sustancia útil, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) inhibir la expresión de al menos un gen entre los genes, que están presentes en una cepa para la producción de la sustancia útil y participa en la vía de biosíntesis de la sustancia útil, mediante el uso del ARNs de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se dirige al gen; y
- (b) seleccionar el gen cuya expresión se inhibió, como el gen que necesita ser delecionado para producir la sustancia útil, en el caso en el que el rendimiento de la producción de la sustancia útil aumenta mediante la inhibición de la expresión del gen.

55 7. Un procedimiento para mejorar una cepa para producir una sustancia útil, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) inhibir la expresión de al menos un gen entre los genes, que están presentes en una cepa para la producción de la sustancia útil y participa en la vía de biosíntesis de la sustancia útil, mediante el uso del ARNs de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se dirige al gen;
- (b) seleccionar el gen cuya expresión se inhibió, como el gen que necesita ser delecionado para producir la

sustancia útil, si el rendimiento de la producción de la sustancia útil aumenta mediante la inhibición de la expresión del gen; y

(c) construir una cepa recombinante que tiene una delección del gen seleccionado o una combinación de los genes seleccionados.

- 5 8. Un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir tirosina, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la inactivación de las funciones de los genes *tyrR* y *crsA* en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina, en la que las funciones de los genes *tyrR* y *crsA* se inactivan mediante la introducción o la expresión de un ARNs sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de tirosina para inhibir la expresión de los genes *tyrR* y *crsA* y, en el que el microorganismo recombinante comprende dicho ARNs sintético.
- 10 9. El microorganismo recombinante de la reivindicación 8, en el que el microorganismo tiene uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en policétido sintasa A de tipo I de síntesis de fenoltiocerol, transcetolasa, 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa, shikimato cinasa I, y prefenato deshidrogenasa que se introducen o se amplifican en el mismo.
- 15 10. El microorganismo recombinante de la reivindicación 8, en el que la policétido sintasa A de tipo I de síntesis de fenoltiocerol o la transcetolasa se expresa mediante un promotor fuerte, y la 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa, shikimato cinasa I, o prefenato deshidrogenasa se expresan por un promotor débil.
- 20 11. El microorganismo recombinante de la reivindicación 8, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*, y *Cyclobacterium*.
- 25 12. Un microorganismo recombinante que tiene una capacidad para producir fenol, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la introducción o la amplificación de un gen *tpl* en el microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 30 13. Un microorganismo recombinante que tiene una capacidad mejorada para producir cadaverina, obteniéndose el microorganismo recombinante mediante la inactivación de la función de al menos un gen en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de cadaverina, en la que las funciones de los genes se inactivan mediante la introducción o la expresión de un ARNs sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una célula hospedadora que tiene la vía de biosíntesis de cadaverina para inhibir la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en *murE*, *metB*, *thrL* y *ackA* y, en el que el microorganismo recombinante comprende dicho ARNs sintético.
- 35 14. El microorganismo recombinante de la reivindicación 13, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, *Rhizobium*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*, y *Cyclobacterium*.

FIG. 1

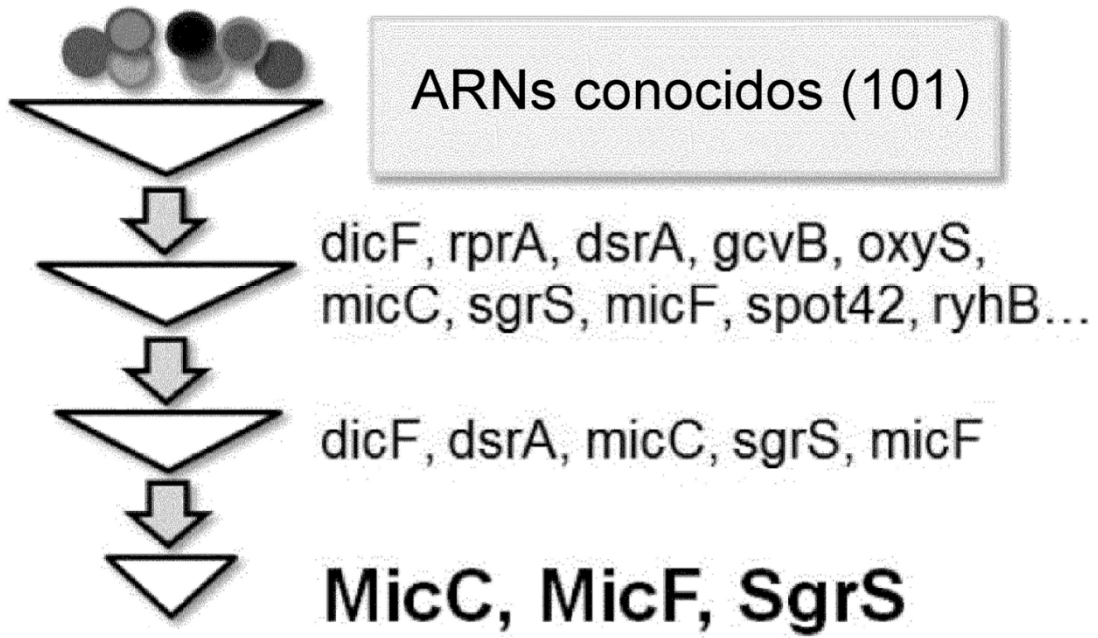


FIG. 2

SgrS

GATGAAGCAA GGGGGTGCCC CATGCGTCAG TTTTATCAGC ACTATTTTAC CGCGACAGCG
 AAGTTGTGCT GGTTCGCTTG GTTAAGCGTC CCACAACGAT TAACCATGCT TGAAGGACTG
 ATGCAGTGGG ATGACCGCAA TTCTGAAAGT TGA~~cttacct~~ ~~gcatcatgtg~~ ~~tgactgaagta~~
~~ttggtgtaaa~~ ATCACCCGCC AGCAGATTAT ACCTGCTGGT TTTTTT (SEQ ID NO: 139)

MicC

~~gttataatgcc~~ ~~tttattgtca~~ ~~cagattttat~~ TTTCTGTTGG GCCATTGCAT TGCCACTGAT
 TTTCCAACAT ATAAAAAGAC AAGCCCGAAC AGTCGTCCGG GCTTTTTTTC TCGAG
 (SEQ ID NO: 140)

MicF

~~gctatcatca~~ ~~tttaactttat~~ ~~ttattaccgt~~ ~~catTCATTTC~~ TGAATGTCTG TTTACCCCTA
 TTTCAACCGG ATGCCTCGCA TTCGGTTTTT TTT (SEQ ID NO: 141)

ARNm de DsRed2

SUR estimado

(SEQ ID NO: 142)

TTATTAATTA ~~aaggaggaca aatatatggc gagcagtgag aacgtcatCA~~ CCGAGTTCAT

3' TTCCTCCTGT TTATATACCG CTCGTCAC TC TGCAGTA 5' **Anti-DsRed2**
 (SEQ ID NO: 143)

FIG. 3

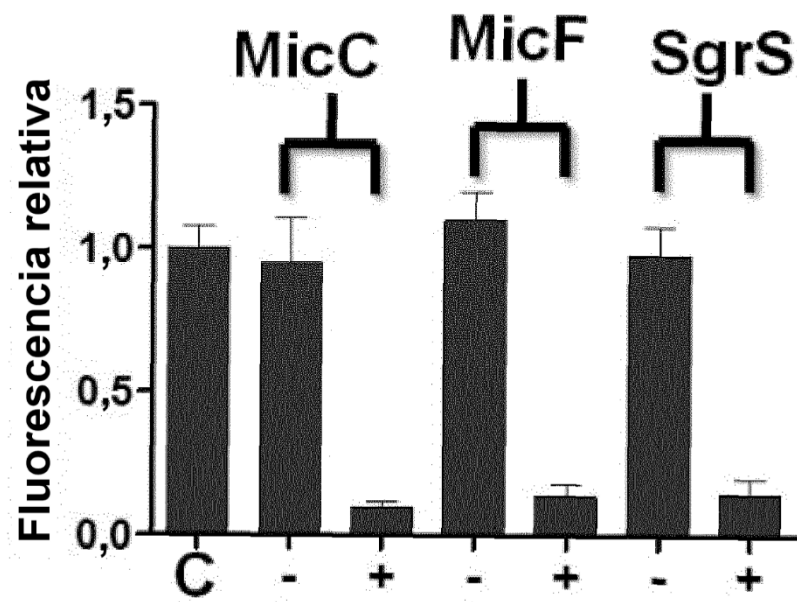


FIG. 4

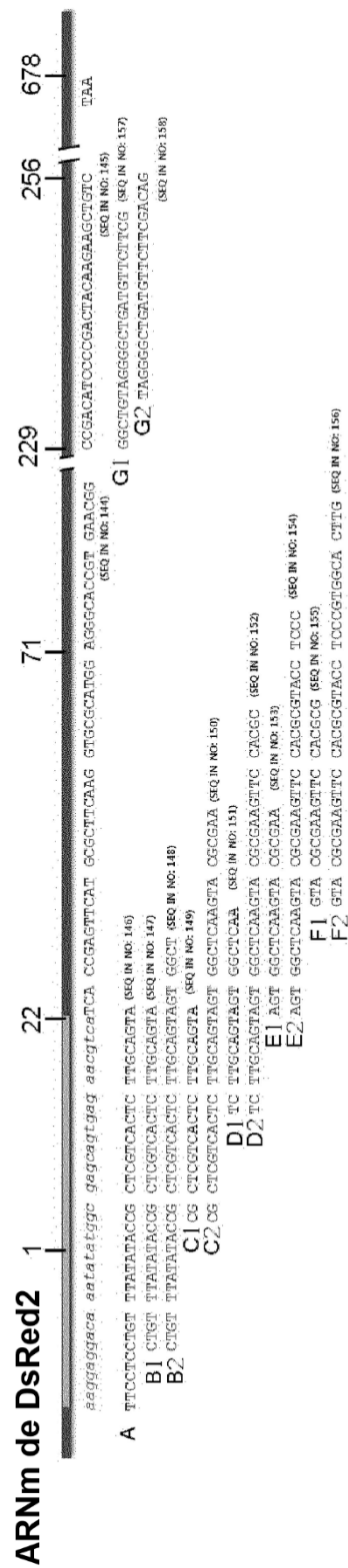


FIG. 5

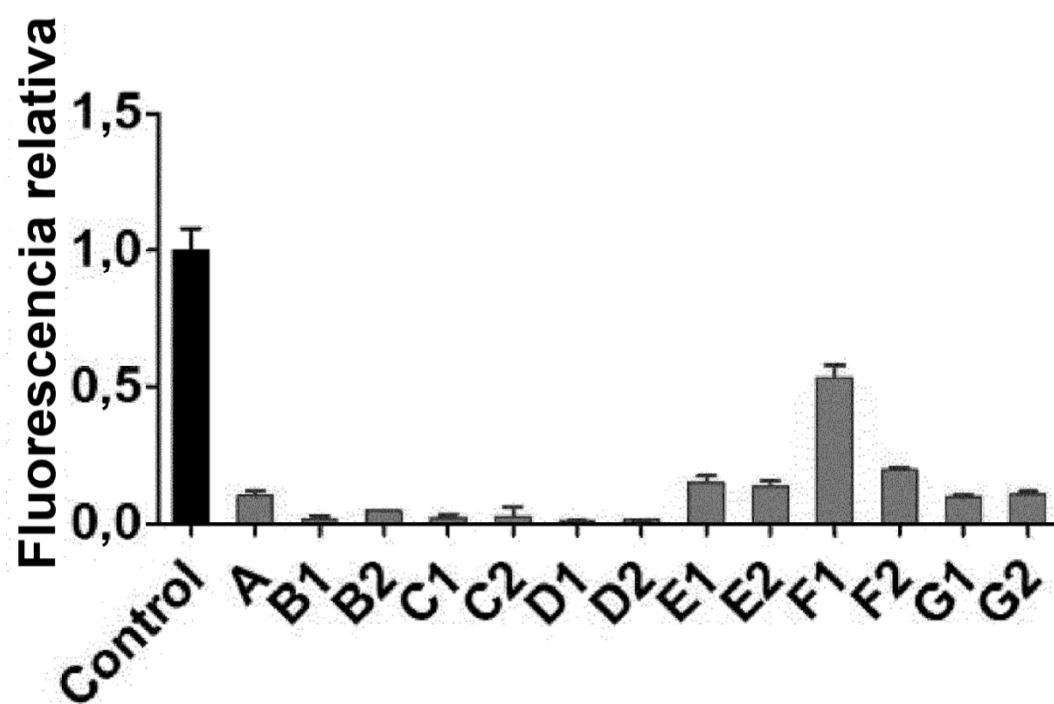


FIG. 6

ARNm AraC

ttaattaa AAGGAGAAAAACGGATGGCTGAAGCGCAAAATGATC cctgctgccg (SEQ ID NO: 159)
TTCCTCTTTTGCCTACCGACTTCGCGTTTACTAG (SEQ ID NO: 160)

Anti-AraC

ARNm LuxR

ttaattaa AAGGAGCAATCAAAATGAACATCAAGAACATCAACG cgaacgagaag (SEQ ID NO: 161)
TTCCTCGTTAGTTTACTTGTAGTCTTGTAGTTGC (SEQ ID NO: 162)

Anti-LuxR

ARNm Kan^R

ttttaatt AAGGAGTCGTTTACATGATTGAACAAGATGGATTGC acgcaggttct (SEQ ID NO: 163)
TTCCTCAGCAAATGTACTAAGTTGTCTACCTAACG (SEQ ID NO: 164)

Anti-Kan^R

FIG. 7

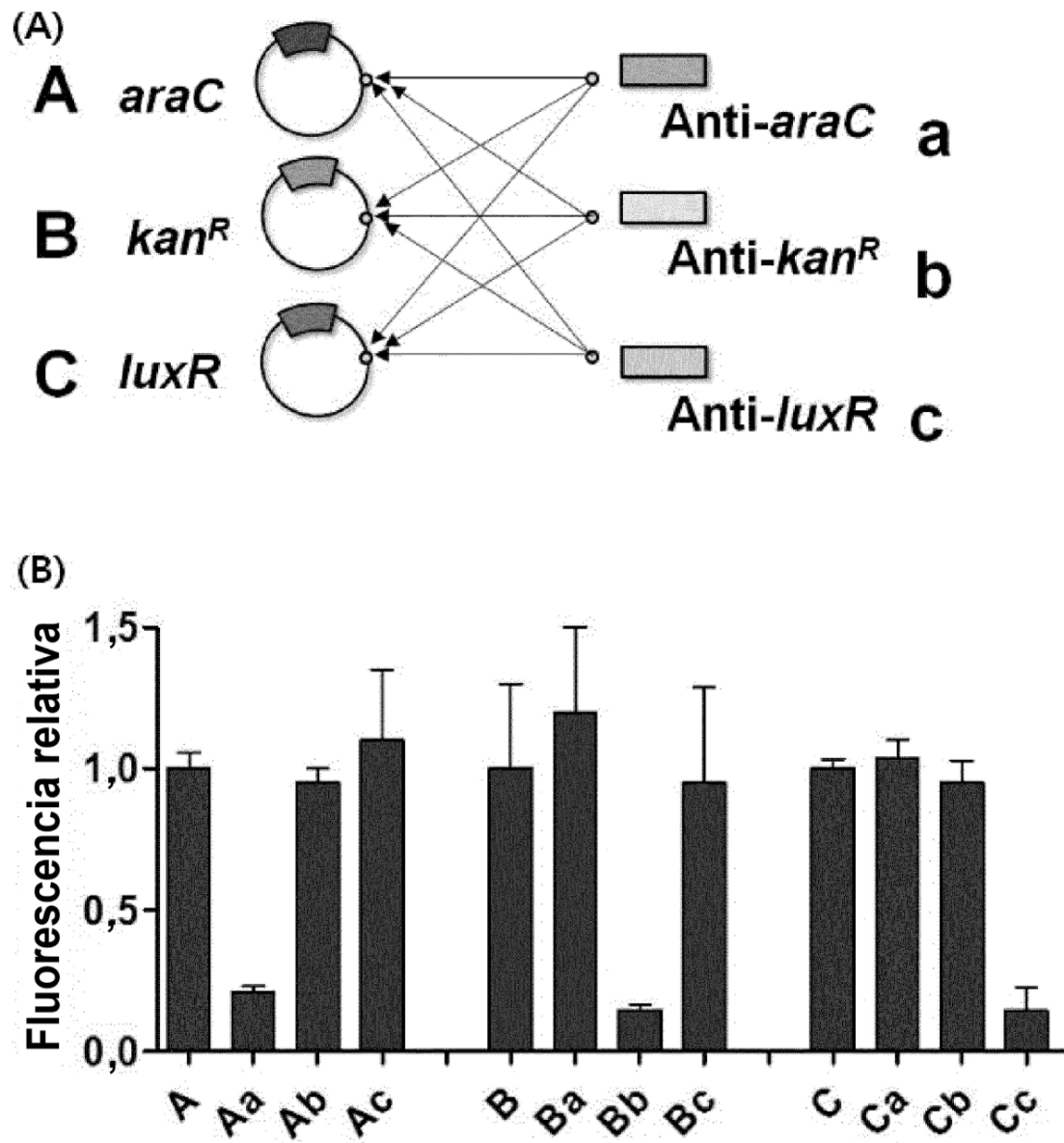


FIG. 8

ARNs	ARNm diana		
	LuxR	Kan ^R	AraC
Anti-LuxR	-53,7	-17,5	-14,1
Anti-Kan ^R	-12,2	-56,2	-13,1
Anti-AraC	-13,5	-15,4	-59,5

FIG. 9

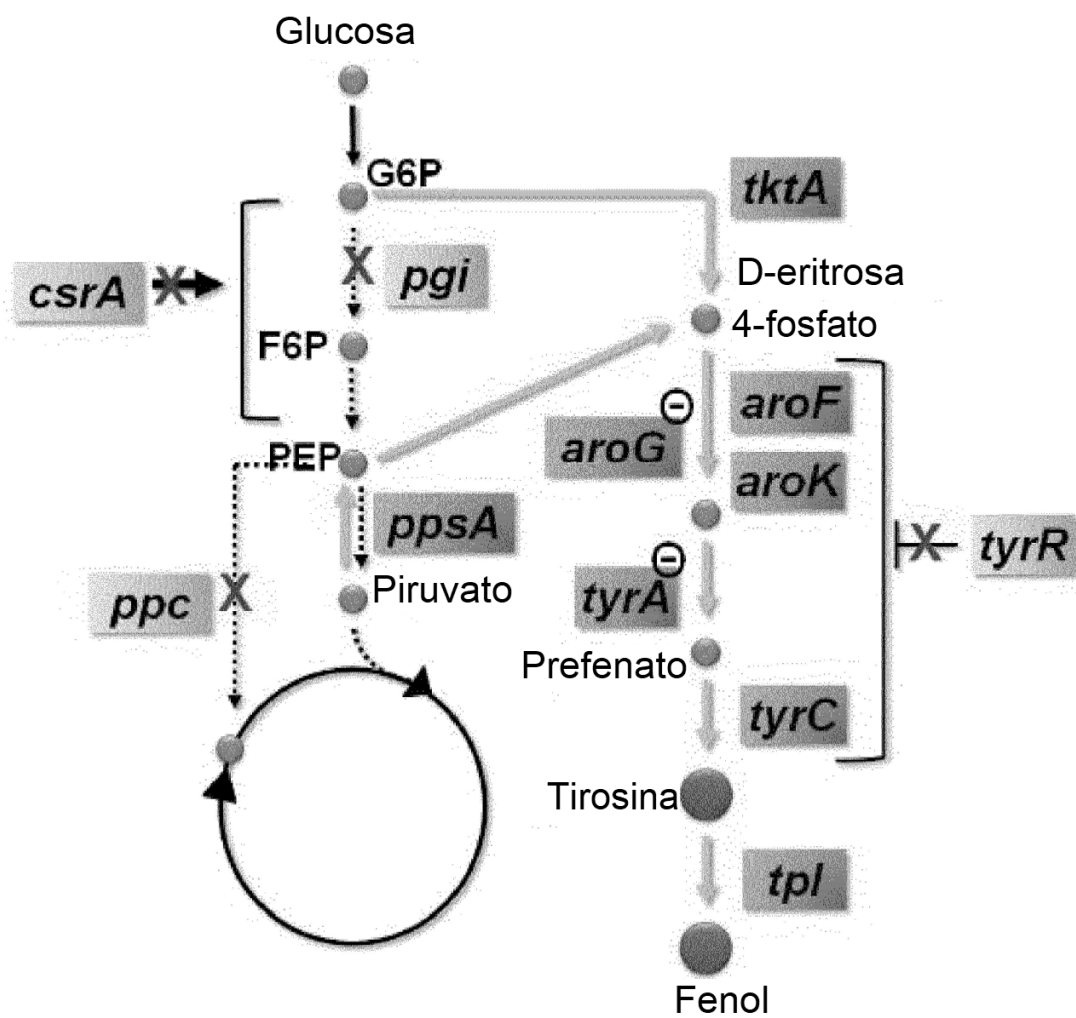


FIG. 10

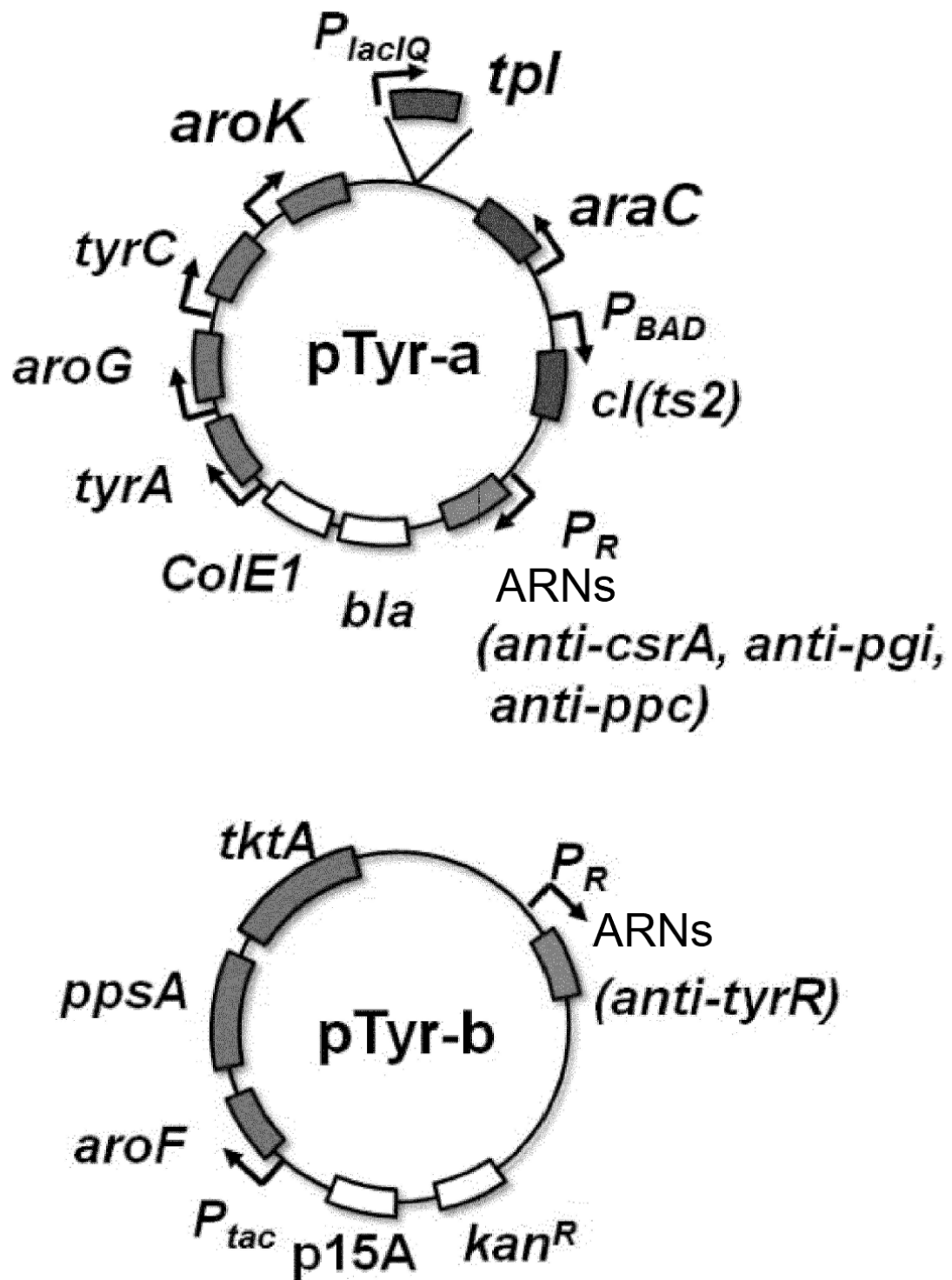


FIG. 11

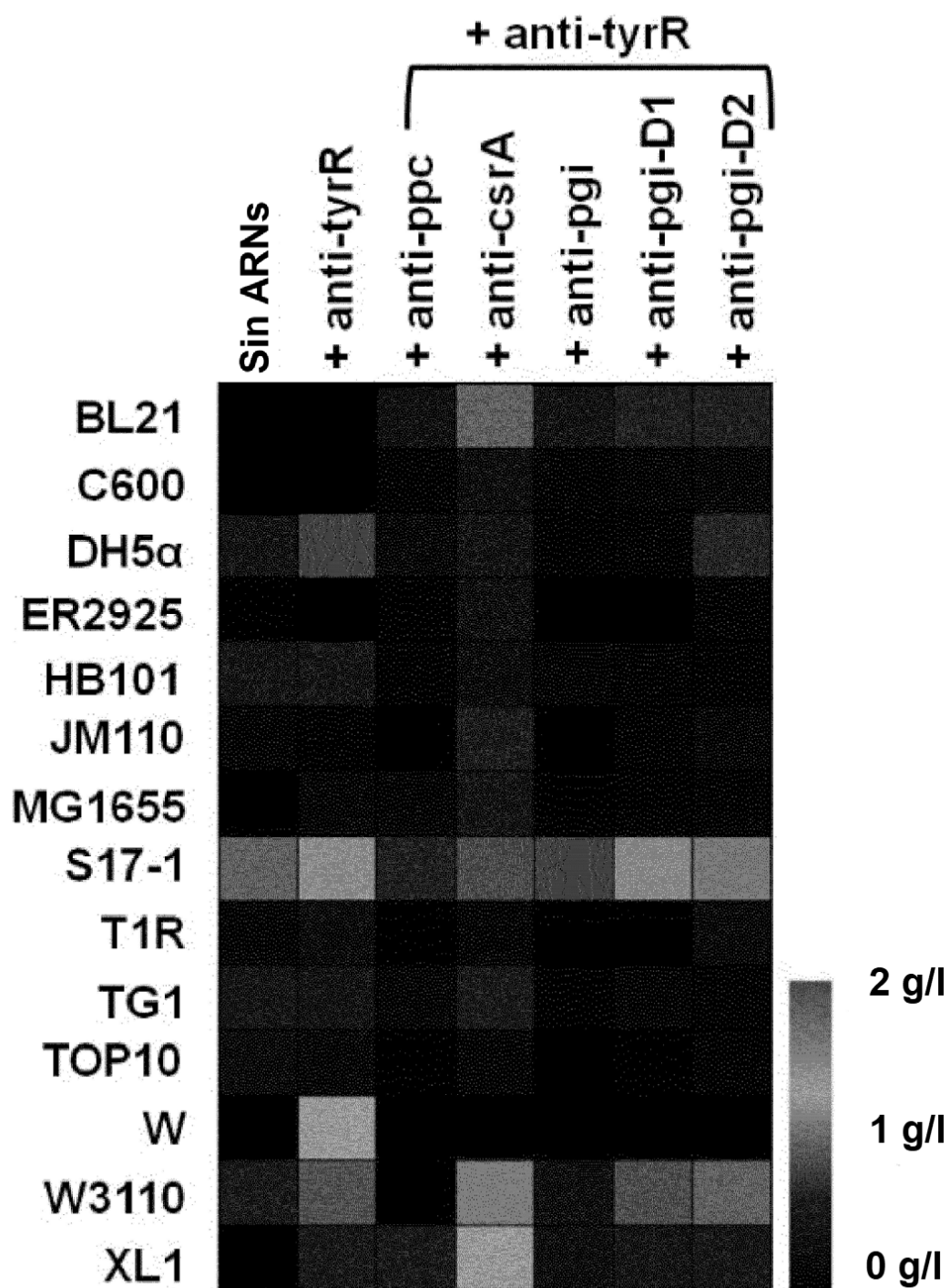


FIG. 12

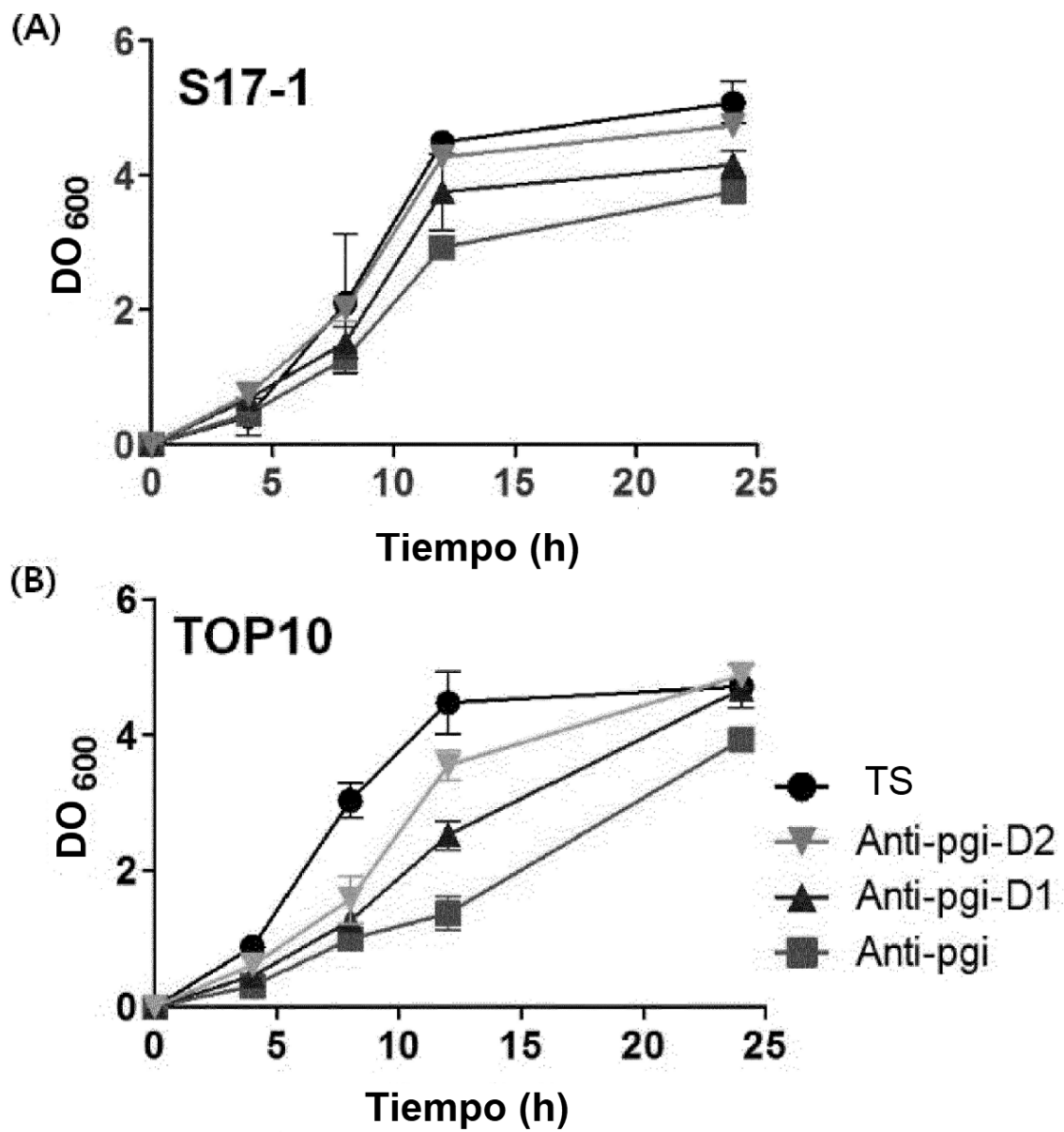


FIG. 13

ARNm de pgi	ATGAAAAACA TCAATCCAAC GCAG (SEQ ID NO: 165)
	:::::::::::: :::::::::::::: ::::
ARNs (anti-pgi)	TACTTTTTGT AGTTAGGTTG CGTC (SEQ ID NO: 166)
ARNs (anti-pgi-D1)	TACTTTTTGT AGT-AGGTTG CGTC (SEQ ID NO: 167)
ARNs (anti-pgi-D2)	TACTTTTTGT AG--AGGTTG CGTC (SEQ ID NO: 168)

FIG. 14

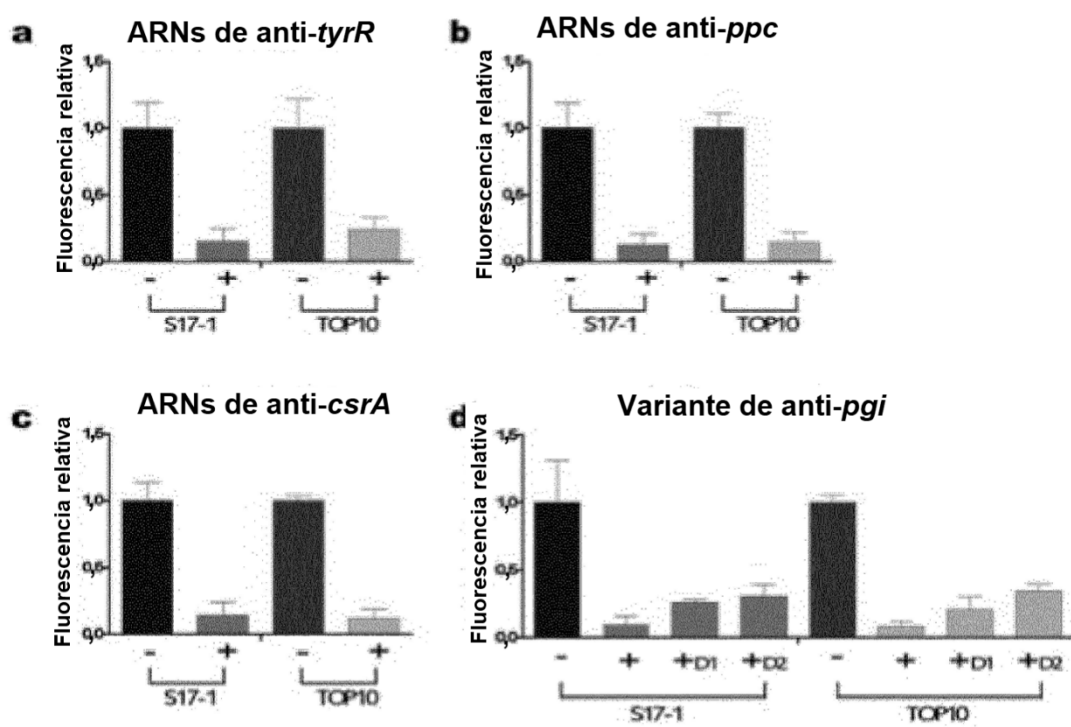


FIG. 15

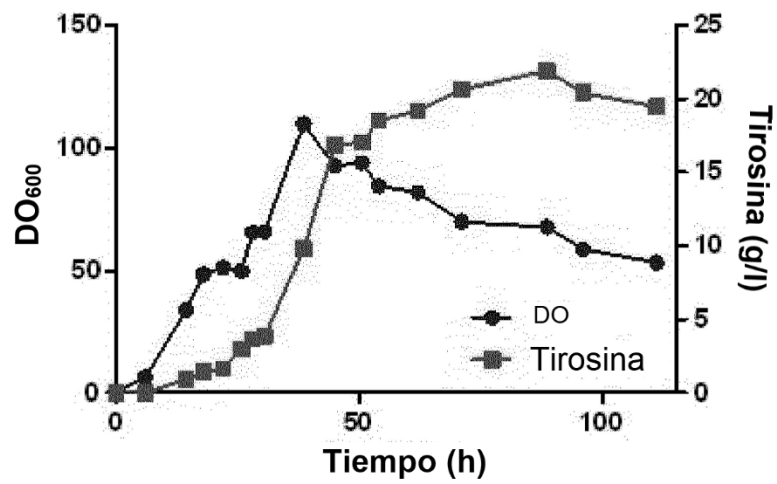


FIG. 16

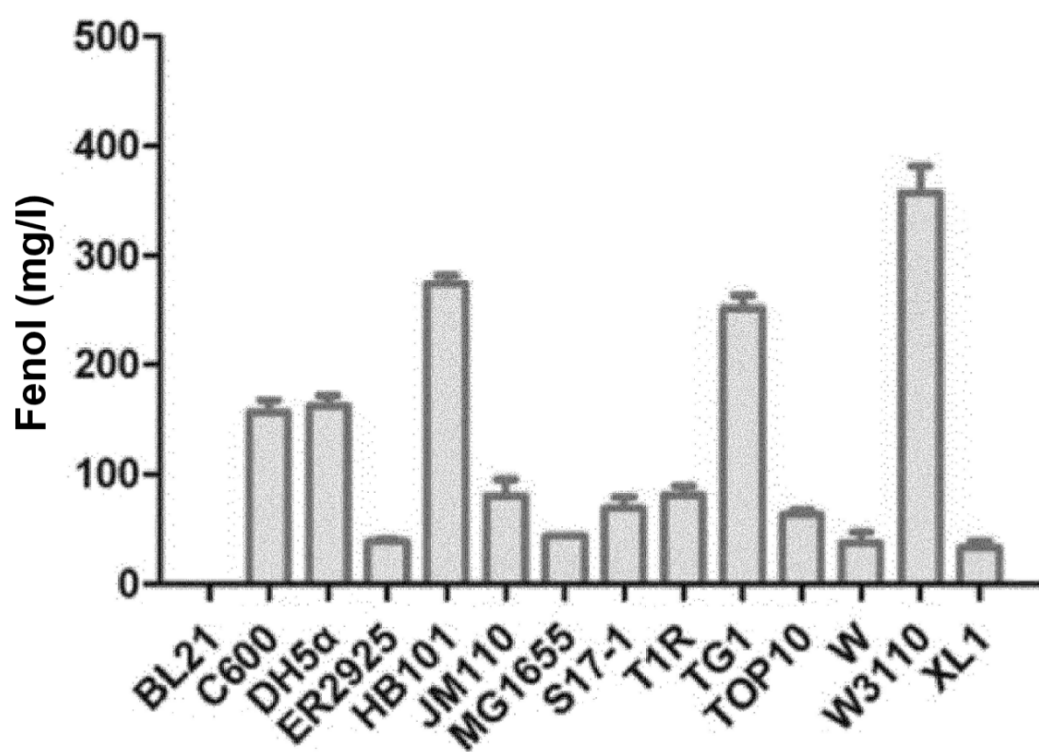


FIG. 17

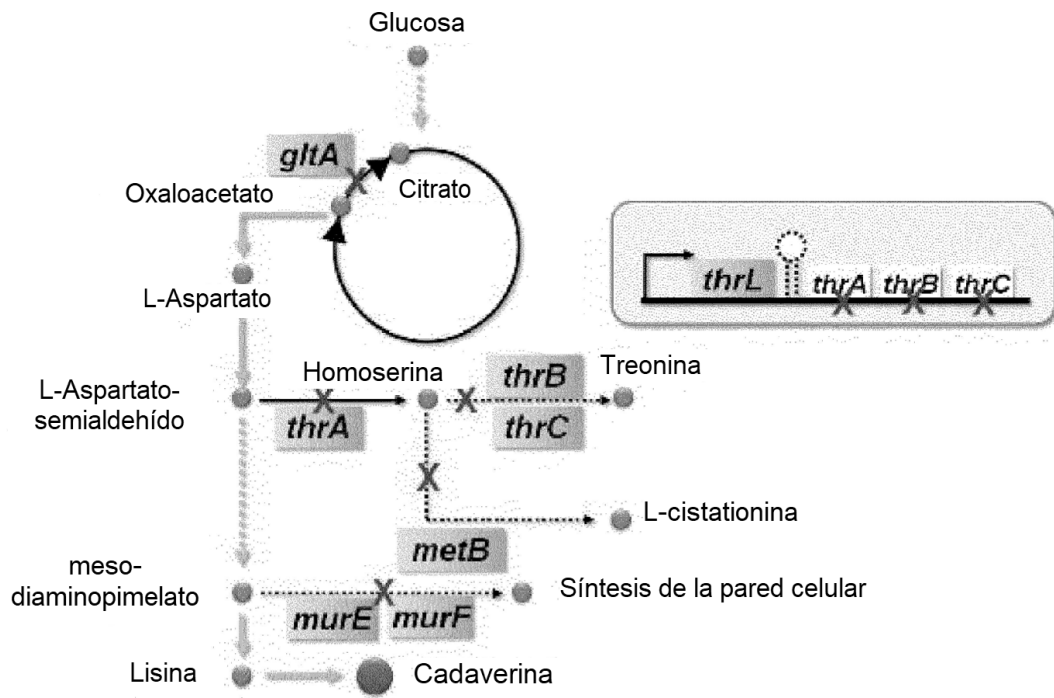


FIG. 18

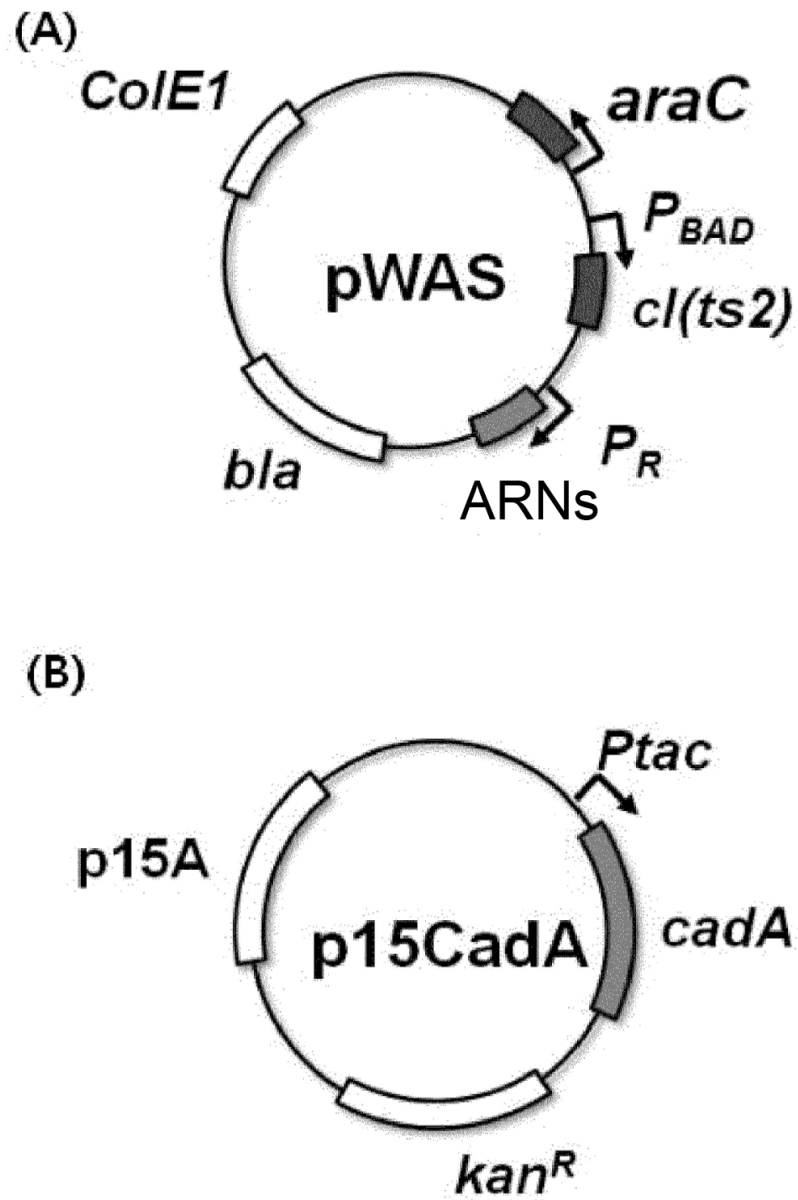


FIG. 19

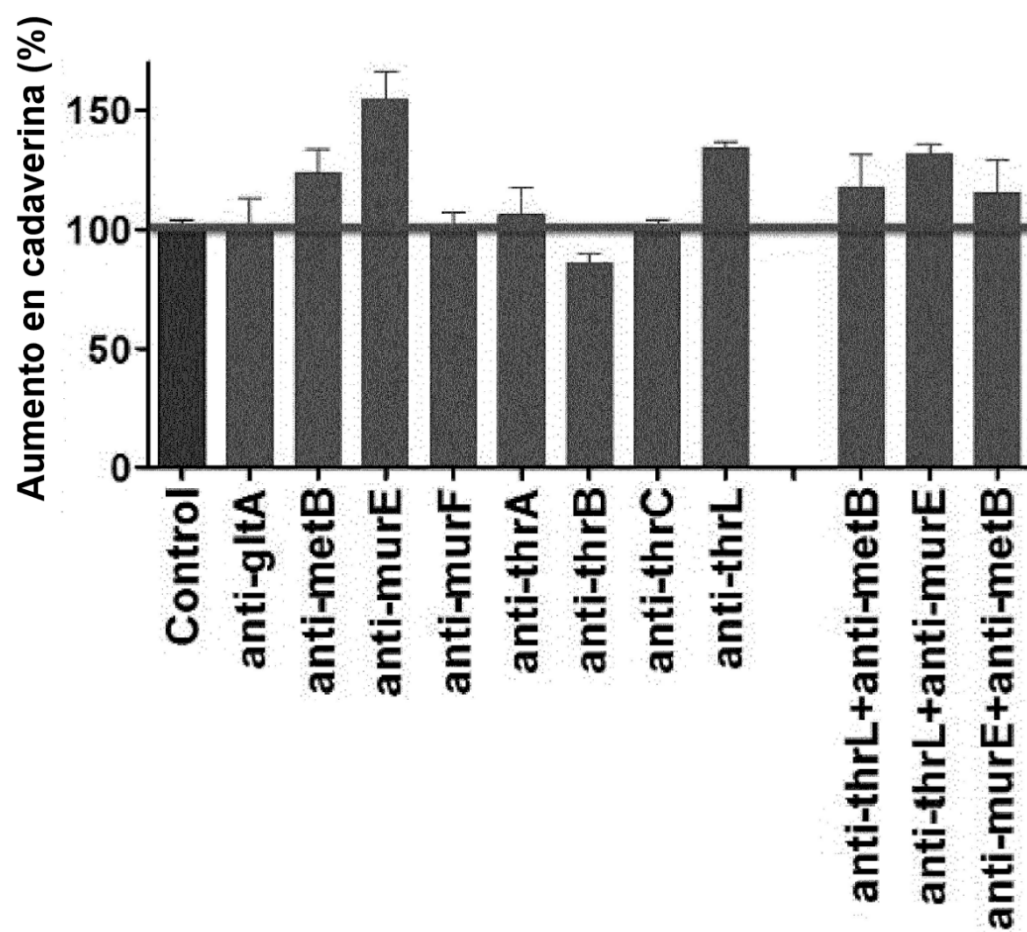


FIG. 20

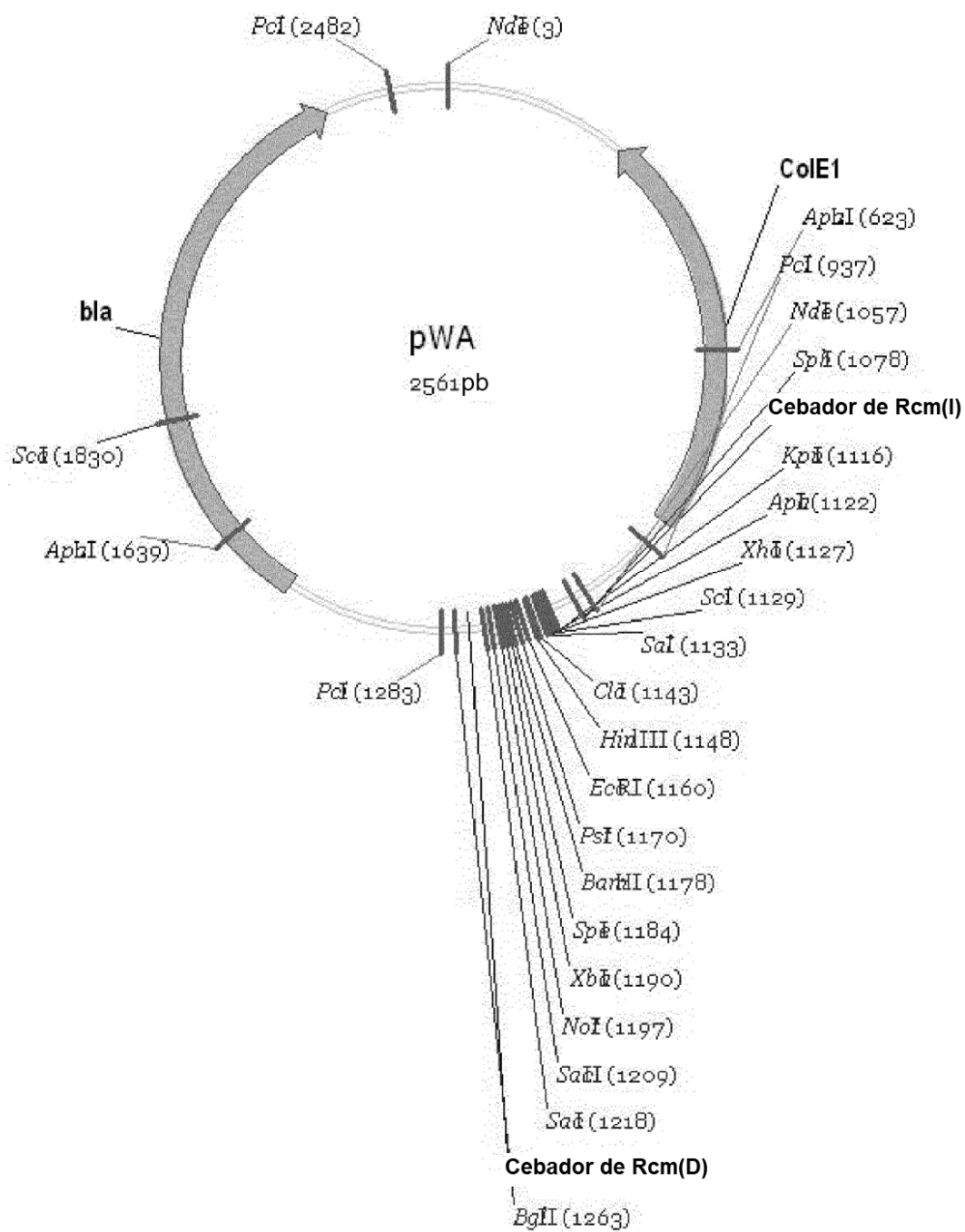


FIG. 21

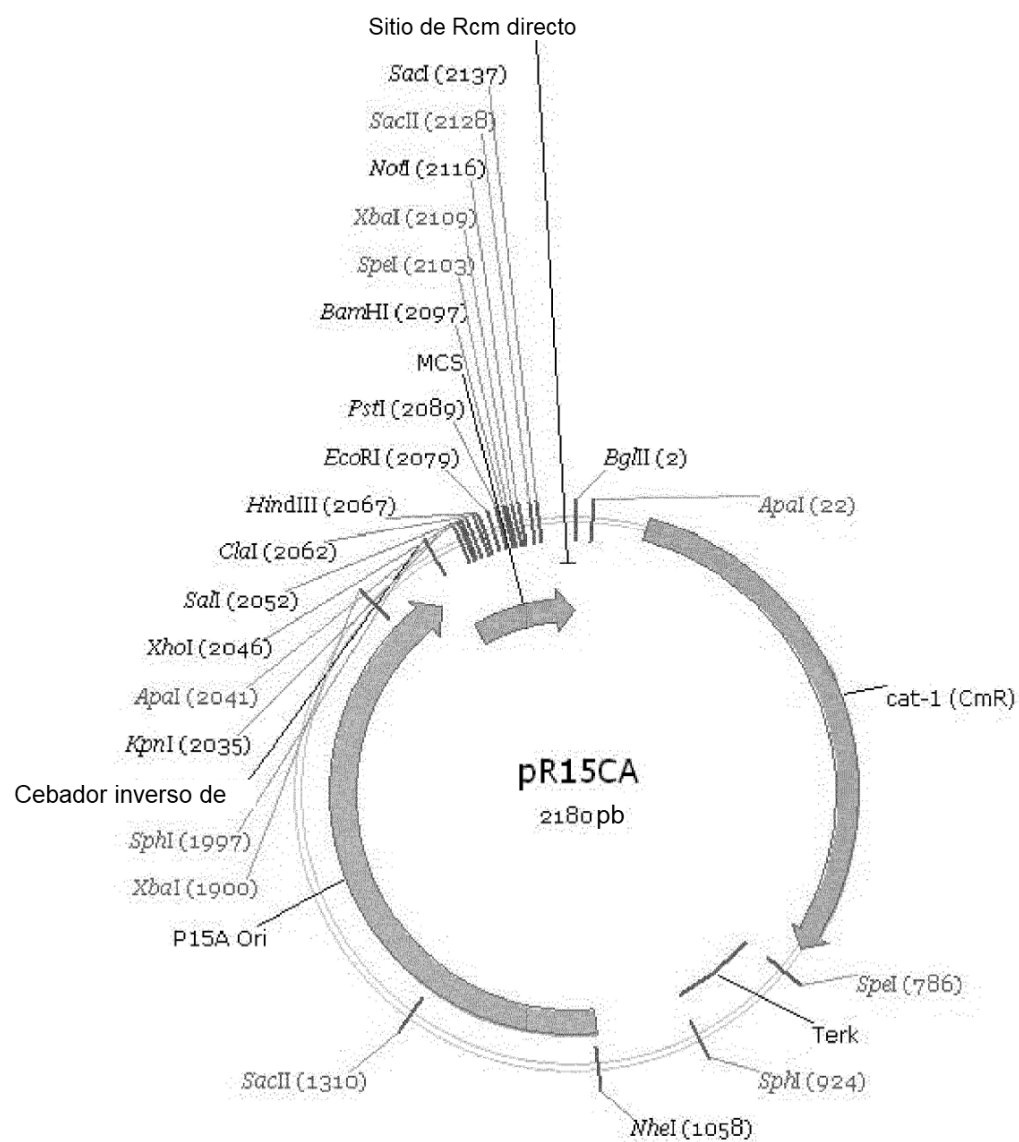


FIG. 22

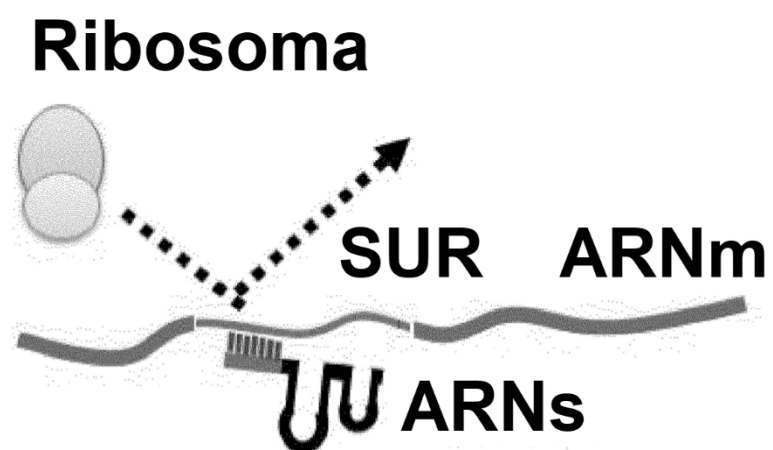
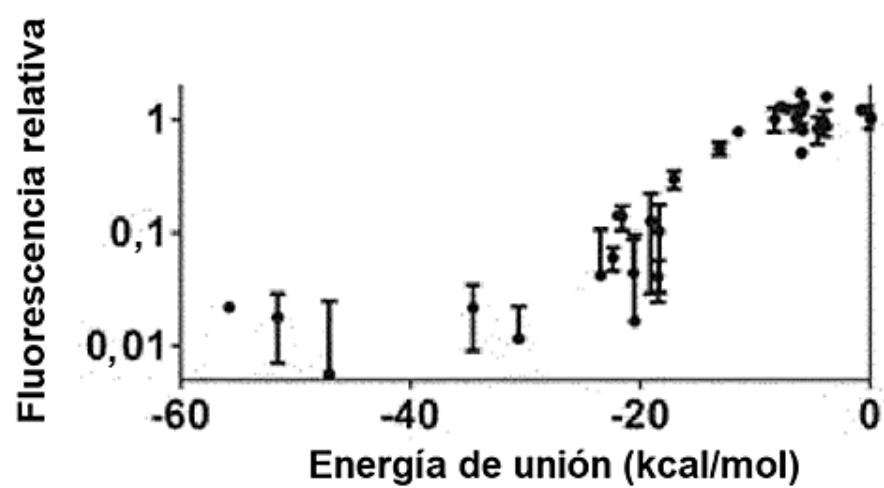


FIG. 23

A. DsRed2



B. LacZ

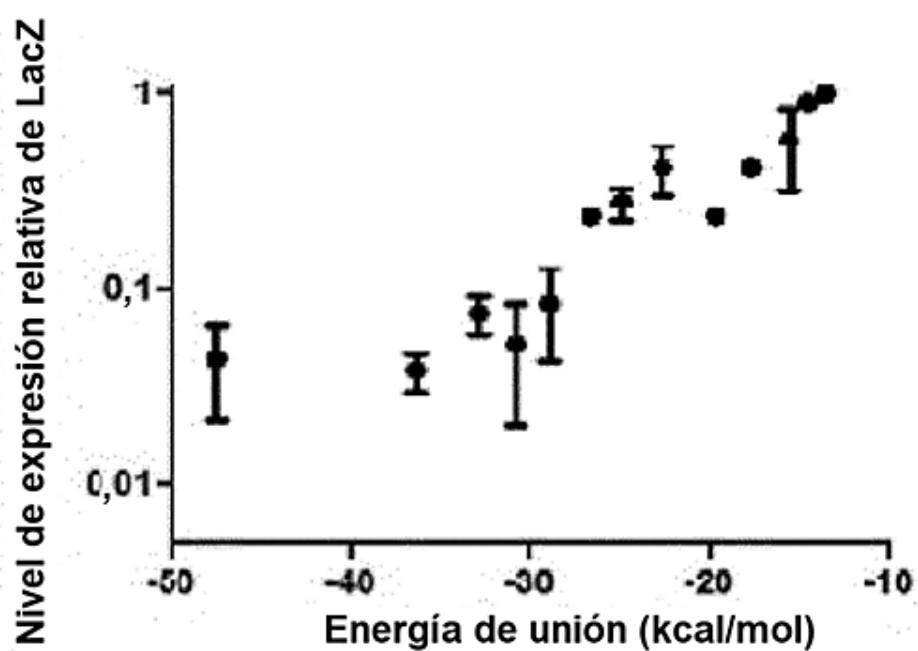


FIG. 24

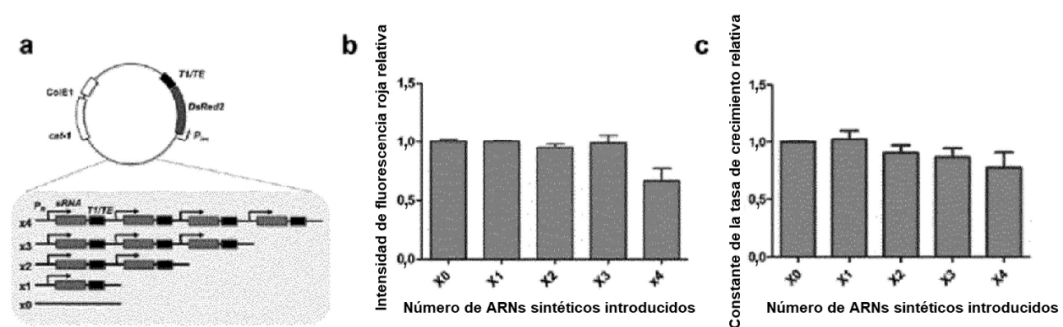


FIG. 25

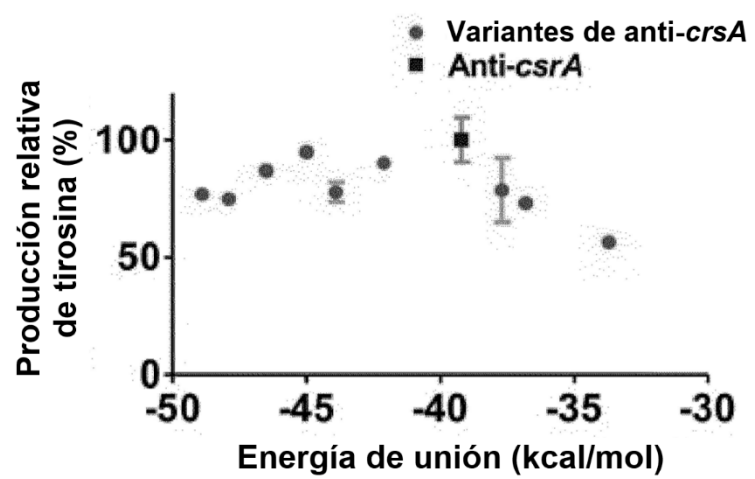


FIG. 26

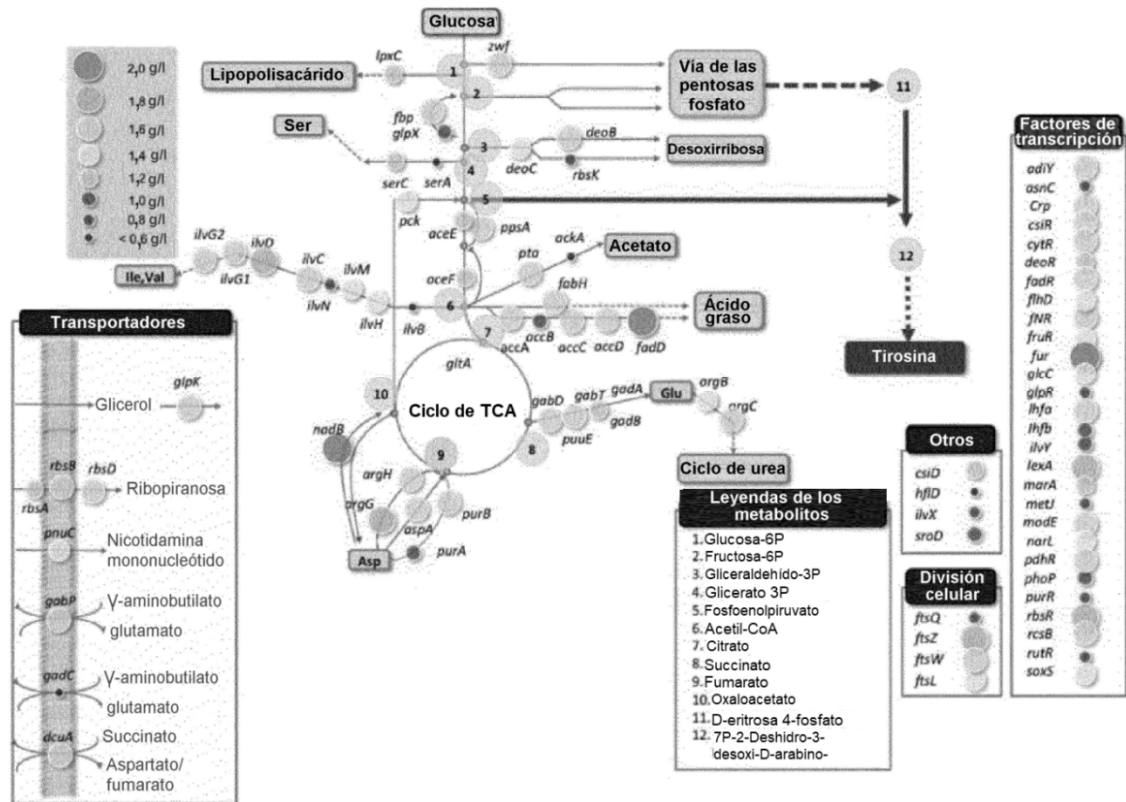


FIG. 27

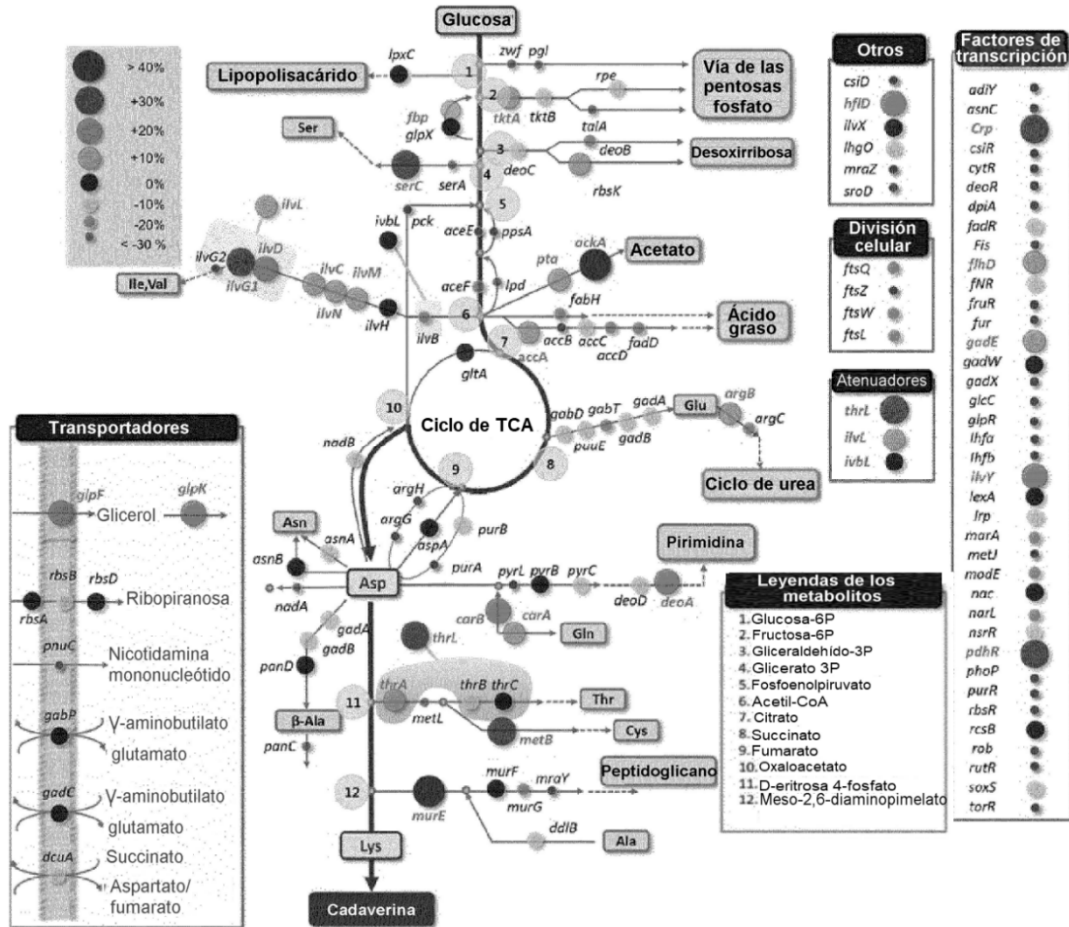


FIG. 28

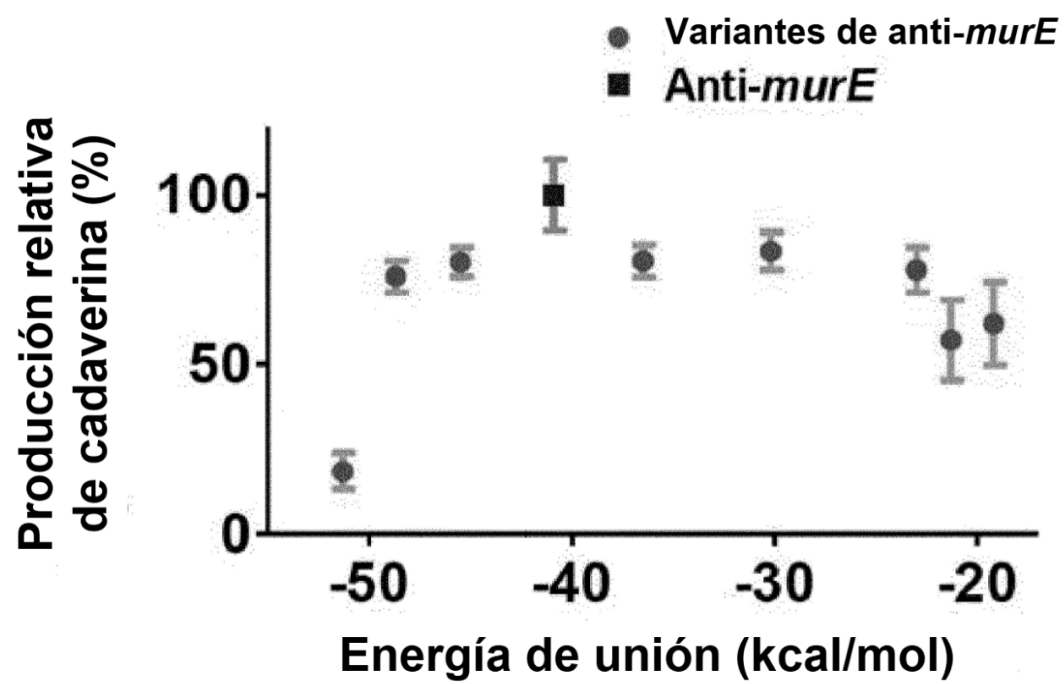


FIG. 29

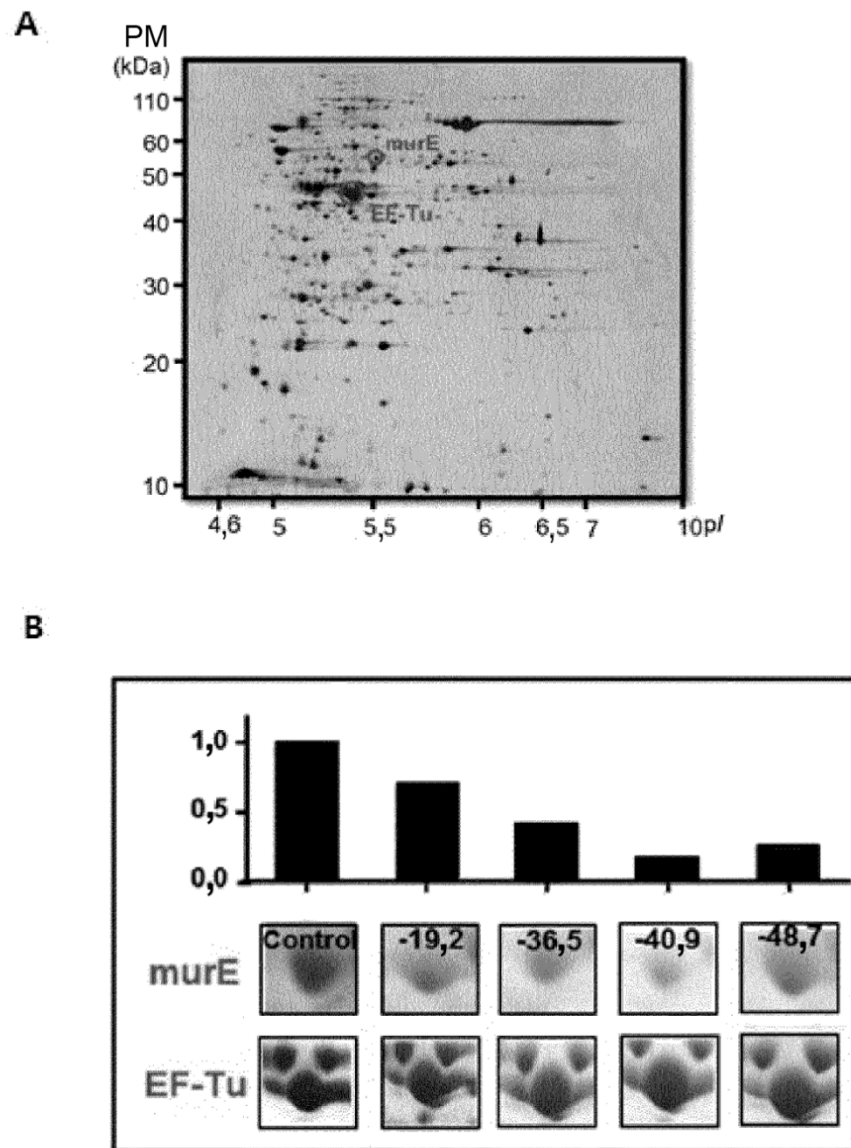


FIG. 30

