



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 256**

51 Int. Cl.:
C12N 15/74 (2006.01)
C10G 32/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01200582 .3**
96 Fecha de presentación : **19.02.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1127943**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

54 Título: **Medios y procedimientos para la expresión de proteínas homólogas y heterólogas en cepas de *Rhodococcus*.**

30 Prioridad: **24.02.2000 IT MI00A0332**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **ENI S.p.A.**
Piazzale E. Mattei 1
00144 Rome, IT

72 Inventor/es: **Margarit y Ros, Immacolata;**
Serbolisca, Luca Paolo;
De Ferra, Francesca y
Rodriguez, Francesco

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 315 256 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).

ES 2 315 256 T3

DESCRIPCIÓN

Medios y procedimientos para la expresión de proteínas homólogas y heterólogas en cepas de *Rhodococcus*.

5 La presente invención se refiere a un nuevo activador constitutivo de *Rhodococcus*, a un vector de expresión que contiene dicho activador, a microorganismos transformados con el vector de expresión y a su utilización en la producción de proteínas.

10 Las bacterias del tipo *Rhodococcus* son de gran interés en el campo de la biodegradación y transformación de compuestos orgánicos (Warhurst y Fewson, 1994, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14:29-73).

15 Son conocidos los procedimientos, por ejemplo, que utilizan cepas de *Rhodococcus* para la eliminación selectiva del azufre de combustibles fósiles (documentos US n° 5.358.870, US n° 5.132.219, PCT/US92/01868, EP-445896) y para la producción de enzimas implicadas en la producción de acrilamidas (Kobayashi *et al.*, 1992, *Tends Biotechnol.*, 10:402-408), ácidos carboxílicos, L-aminoácidos (documento WO 98/04733) y enantiomorfos de compuestos quirales (documento US n° 5.672.504).

20 El principal factor de restricción en los procesos optimizadores de biocatálisis que utiliza estas bacterias es no obstante la falta de instrumentos genéticos adecuados.

Este término se refiere a los vectores de expresión en *Rhodococcus* que:

- están presentes en las células en múltiples copias;
- 25 - se mantienen constantemente en el interior de las células sin agentes selectivos costosos (por ejemplo, antibióticos), que influyen de manera considerable en la conveniencia económica de un proceso industrial; y
- 30 - contienen un activador potente, es decir, que puede permitir una expresión eficaz de un gen, o un activador constitutivo potente que no requiere la utilización de inductores y no es sensible a los represores.

35 De hecho, un límite en la eliminación del azufre orgánico de los combustibles fósiles con las cepas de *Rhodococcus* que producen el complejo enzimático sox, es debido a la presencia, corriente arriba de los correspondientes genes, de un activador muy inhibido por el sulfato.

40 Para superar este inconveniente, los genes que codifican este complejo enzimático se colocaron en vectores de *Rhodococcus* bajo el control de activadores constitutivos heterólogos tales como los del gen con resistencia al cloranfenicol de *Rhodococcus fascians* (Piddington, C.S. *et al.*, 1995, *Appl. and Env. Microbiol.*, 61,2.: 468-475) o del gen sacB de *B. subtilis* (Denis-Larose, C. *et al.*, 1998, *Appl. and Env. Microbiol.*, 64,11.;4363-4367) y del gen con resistencia a Kanamicina de *E. coli* (Serbolisca *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52:122-126). El mantenimiento de los vectores, sin embargo, requería la presencia de un agente selectivo en el medio de cultivo y, además, la expresión del operón sox bajo el control del activador sac B demostró ser muy baja (Lau. P. *et al.* 1999 ACS Fuel Chem.: 32-33).

45 Otro documento de la técnica anterior da a conocer los vectores de clonación y expresión para *Rhodococcus*, en el que se utilizaron los genes rep, repA y repB, el gen par A y el gen con resistencia al cloranfenicol (De Mot Rene *et al.*, *Microbiology* 1997, 143, 10: 3137-3147).

50 El problema técnico objetivo resuelto por la presente invención consiste en proporcionar un activador alternativo de *Rhodococcus* y el vector de expresión que debe utilizarse para la eliminación del azufre orgánico de los combustibles fósiles.

55 Se ha descubierto ahora que los inconvenientes de la técnica anterior descritos anteriormente pueden superarse por medio del vector de expresión de la presente invención.

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un nuevo activador constitutivo de *Rhodococcus* capaz de dirigir la expresión de un gen homólogo o heterólogo con una gran eficacia y se caracteriza por la secuencia SEC. ID. n° 2.

60 Otro objeto de la presente invención se refiere a un vector de expresión en *Rhodococcus* que comprende dicho activador constitutivo.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una cepa de *Rhodococcus* transformada con dicho vector de expresión.

65 Otro objeto todavía de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de proteínas homólogas o heterólogas en bacterias *Rhodococcus* transformadas con dicho vector de expresión.

ES 2 315 256 T3

Los objetos adicionales de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción y ejemplos siguientes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra la cartografía de restricción del plásmido pSM841 de 11 kb.

Figura 2: muestra la cartografía de restricción del plásmido pSM843 de 7,3 kb.

Figura 3: muestra la cartografía de restricción del plásmido pSM839 de *E. coli*.

Figura 4: muestra la cartografía de restricción del plásmido pSM846.

Figura 5: muestra la cartografía de restricción del plásmido pSM847.

En particular, el vector de expresión según la presente invención comprende:

- (a) los genes de rep, ORF81 y trbA que codifican proteínas implicadas en la replicación en *Rhodococcus*;
- (b) un gen denominado parA cuyo producto es necesario para mantener el plásmido en ausencia de presión selectiva y se caracteriza por la secuencia SEC. ID. n°: 1;
- (c) un activador constitutivo de *Rhodococcus* que presenta la secuencia SEC. ID. n°: 2;
- (d) una secuencia de clonación múltiple corriente abajo del activador; y
- (e) por lo menos un gen que codifica un marcador genético seleccionado, por ejemplo, de entre los genes del operón cad (SEC. ID. n°: 3), que proporciona resistencia al cadmio o los genes que codifican la resistencia a un antibiótico.

El vector de expresión contiene asimismo el origen de la replicación en *E. coli* y pueden por lo tanto utilizarse como vector lanzadera en *Rhodococcus* y *E. coli*.

El vector de expresión, indicado a continuación como pSM846, se obtuvo por:

- (1) construcción del vector de clonación pSM843 que comprende:
 - (a) los genes de rep, ORF81 y trbA que codifican las proteínas implicadas en la replicación en *Rhodococcus*;
 - (b) el gen parA que presenta la secuencia SEC. ID. n°: 1; y
 - (c) por lo menos un gen que codifica un marcador genético seleccionado de entre los genes del operón cad, que proporcionan resistencia al cadmio, o los genes que codifican la resistencia a un antibiótico;
- (2) aislamiento de un activador constitutivo de *Rhodococcus* que presenta la secuencia SEC. ID. n°: 2; y
- (3) inserción de dicho activador constitutivo en el vector pSM843.

El vector del plásmido pSM843 se preparó reduciendo las dimensiones del plásmido de 130 kb de *Rhodococcus sp.* DS7 que contiene el operón sox, los genes que proporcionan resistencia al cadmio, y los que proporcionan resistencia al arsénico (Margarit *et al.*, 1997 y Serbolisca *et al.*, 1999). Esta reducción se efectuó mediante la estrategia siguiente:

- (a) búsqueda de los plásmidos procedentes de la eliminación del plásmido de 130 kb después de la transformación de una cepa receptora y aislamiento de un plásmido de 22 kb;
- (b) digestión de dicho plásmido con enzimas de restricción adecuadas, auto-ligasa e aislamiento del plásmido pSM841 de 11 kb;
- (c) caracterización del plásmido obtenido en (b) y
- (d) construcción del plásmido pSM843 de 7,3 kb que contiene por lo menos un marcador genético y los genes parA, rep y trbA respectivamente, necesarios para la estabilidad y replicación en *Rhodococcus*.

La estabilidad de los vectores obtenidos se controló después de cada reducción con el fin de seleccionar solamente los mantenidos en por lo menos el 90% de las células de la cepa hospedadora durante por lo menos 30 a 40 generaciones, en medio completo y en ausencia de presión selectiva.

ES 2 315 256 T3

La investigación en los activadores constitutivos dentro del cromosoma de una cepa de *Rhodococcus* fue efectuada para la construcción del vector de expresión, utilizando un nuevo procedimiento.

Este procedimiento se basa en la observación de que las cepas de *Rhodococcus* tienen capacidad de integración en fragmentos aleatorios del ADN extraño en su cromosoma, sin necesidad de una homología de secuencia mayor de 3 bp entre el ADN del donante y el del hospedador. La eficacia de integración se estimó en aproximadamente 10^2 - 10^3 colonias por μg de ADN en experimentos de transformación de células de *Rhodococcus*.

El procedimiento de investigación consiste en:

- (i) transformar una cepa de *Rhodococcus* directamente con un gen indicador sin su activador o con un plásmido multicopia de *E. coli* que contiene dicho gen y el gen indicador linealizado corriente arriba;
- (ii) seleccionar los clones que expresan dicho gen, es decir, los clones que presentan integrado el gen indicador en su cromosoma, corriente abajo de una secuencia activadora;
- (iii) digerir el ADN cromosómico de los clones seleccionados con enzimas de restricción que cortan corriente arriba y corriente abajo el gen;
- (iv) ampliar el ADN obtenido en la etapa (iii); y
- (v) secuenciar el activador corriente arriba del gen indicador.

Gen indicador se refiere a un fragmento de ADN que codifica un producto que permite la selección de los clones que lo expresan. Los ejemplos de genes indicadores útiles para este fin pueden seleccionarse de entre los que codifican la resistencia a antibióticos o a metales pesados o a enzimas tales como XylE o las mismas proteínas Sox.

Con respecto a las técnicas utilizadas actualmente, este procedimiento de investigación es mucho más eficaz y rápido y no requiere la preparación de bancos genómicos con fragmentos de ADN cromosómico antes del gen indicador. Este procedimiento puede aplicarse a todos los microorganismos que, como *Rhodococcus*, pueden integrarse en los fragmentos aleatorios del ADN extraño en su cromosoma sin necesidad de gran homología de secuencia entre el ADN del donante y el del hospedador.

Con este procedimiento, se identificó un activador constitutivo de un gen de *Rhodococcus* con la secuencia SEC. ID. n° 2 que está comprendido en el alcance de la presente invención. Este activador se insertó en el vector del plásmido pSM843, obteniéndose el vector de expresión pSM846 que puede utilizarse para la producción de proteínas de interés en *Rhodococcus*.

Se determinó la estabilidad de segregación y estructura del vector de expresión pSM846 en cepas de *Rhodococcus* actuando como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados demostraron que el vector se mantiene en más del 90% de la población celular, incluso después de atenuaciones del cultivo sucesivas con agentes selectivos, mostrando de este modo una gran estabilidad de segregación.

Además, los análisis de los plásmidos aislados a partir de cepas transformadas demostraron que, aún después de varias generaciones en el cultivo líquido, este plásmido permanece estructuralmente estable en diferentes cepas de *Rhodococcus* con de 4 a 8 copias por célula.

El vector de expresión de la presente invención puede utilizarse para la expresión de genes que codifican proteínas de interés tales como, por ejemplo, las enzimas implicadas en la eliminación selectiva del azufre orgánico de combustibles fósiles (SoxA, SoxB, SoxC y SoxD), la producción de L-aminoácidos (amidasa, aspartasa), la producción de enantiomorfos de compuestos quirales (epóxido hidrolasa, cetoesterorreductasa), la producción de ácidos carboxílicos (nitrilasa), etc.

El vector de expresión puede utilizarse en varias especies de *Rhodococcus* y en bacterias filogenéticamente similares tales como *Gordona* y *Nocardia*.

La capacidad del activador de dirigir la expresión constitutiva del gen puesto bajo su control se verificó colocando corriente abajo dicho activador, el operón sox aislado según describe (Serbolisca, L., de Ferra, F., Margarit, I., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52:122-126).

Los resultados obtenidos demostraron que este activador permite una expresión eficaz y constitutiva de las proteínas SoxA, SoxB y SoxC en presencia de azufre inorgánico en el medio de cultivo.

Las cepas que contienen los vectores pSM843, pSM846 y pSM847 se depositaron en cultivos Centraalbureau Voor Schimmel como *Rhodococcus* SMV 112, SMV 113 y SMV 114, donde recibieron los números CBS 102445, 102446 y 102447 respectivos.

ES 2 315 256 T3

Los siguientes se utilizaron en los experimentos descritos a continuación:

- el plásmido de 130 Kb que contiene el operón *sox* que codifica la resistencia al cadmio y al arsénico. Dicho plásmido se aisló de la cepa *Rhodococcus* sp. DS7 (Margarit, I. *et al.*, 1997, 9th Proceedings of the International Conference on Coal Science: 1579-1582);
- el plásmido pSM789, incapaz de autorreplicarse en *Rhodococcus*, obtenido insertando en el plásmido pUC18 de *E. coli*, el fragmento HindIII-EcorRI de 4549 bp que contiene el operón *sox* sin activador aislado de *Rhodococcus* sp. DS7 (Margarit, I. *et al.*, 1997, 9th Proceedings of the International Conference on Coal Science: 1579-1582);

La cepa *Rhodococcus* sp. fue clasificada previamente como *Arthrobacter* basándose en el ensayo microbiológico (D'Addario 1996 Proceedings of the Symposium AAA Biotechnology. Shejbal, E. y Ferrara: 139-149). Posteriormente, una comparación de la secuencia 16 S del ADN con la de los bancos de datos indicaron que la cepa pertenecía al género *Rhodococcus*. Las homologías más constantes se encontraron en *Rhodococcus erithreus* y *Rhodococcus erythropolis*.

- la cepa DS-2 de *Rhodococcus*, obtenida a partir de DS7 *Rhodococcus* sp., es incapaz de desulfurarse ya que no tiene el plásmido de 130 kb (Margarit, I. *et al.*, 1997, 9th Proceedings of the International Conference on Coal Science: 1579-1582).

Los ejemplos siguientes son ilustrativos pero no limitativos del alcance de la propia invención.

Ejemplo 1

Construcción del vector del plásmido pSM843

Células electrocompetitivas de DS-2 de *Rhodococcus* (100 μ l) (BIORAD Gene Pulser TM, 400 ohm, 25 uF) se transformaron con el plásmido de 130 kb (100 ng). Se seleccionaron clones recombinantes en placas de LB-agar que contenían 0,5 mM de CdCl₂ y posteriormente se colocaron en medio mínimo (10 g/l de KH₂PO₄ pH 7,4, 2,5 g/l de NH₄Cl, 0,2 g/l de MgCl₂·6H₂O, 0,02 g/l de CaCl₂, 0,01 g/l de FeCl₃, 0,005 g/l de MnCl₂·2H₂O, 0,003 g/l de ZnCl₂, 0,0009 g/l de CuCl₂·2H₂O, 0,8% de agarosa) que contenía dibenzotiofeno (DBT) como única fuente de azufre. Uno de los clones resistentes al cadmio demostró ser incapaz de desulfurar DBT. Se extrajo el ADN plásmido de este clon, que, después de ensayarse en gel de agarosa al 0,7%, demostró dimensiones de aproximadamente 100 kb.

Actuando como se describió anteriormente, a partir de la transformación de DS-2 con el plásmido de 100 kb, se obtuvo un plásmido de 35 kb que no proporcionó ya resistencia al arsénico, y a partir de éste un plásmido de 22 kb.

Se comprobó la estabilidad del plásmido para los tres vectores con el fin de seleccionar solamente los mantenidos en la cepa del hospedador durante por lo menos 30 a 40 generaciones en ausencia de presión selectiva.

Se digirió el plásmido de 22 kb (1 μ g) con 4 U de la enzima de restricción Sex AI (Boehringer), en 10 μ l de las sales suministradas por el productor, incubando durante 60 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C. El plásmido linealizado (2 μ l) se autoligó en 10 μ l de tampón, en presencia de 1 U de T4 ADN ligasa, durante 16 horas a 16°C. Se utilizó 1 μ l de la mezcla de ligasa para transformar células DS-2 electrocompetentes. Se aisló un plásmido de 18,7 kb de uno de los clones que contenían plásmidos con dimensiones reducidas. Este plásmido se digirió con la enzima EcoRI obteniéndose un vector de 15,8 kb que se redujo más por digestión con las enzimas SspI y DraI, que dejan los extremos truncados.

El plásmido de 11 kb resultante, denominado pSM841 (figura 1), se secuenció y se demostró la presencia de:

- el operón *cad* que proporciona resistencia al cadmio y que presenta la secuencia SEC. ID. n° 3;
- los genes *rep*, ORF81 y *trbA* que codifican las proteínas implicadas en la replicación descrita por Denis-Larose, C. *et al.*, 1998, *App. And Env. Microbiol.*, **64**, 11: 4363-4367. Se identificó una secuencia de 15 bp entre estos dos genes, que, por homología con otras secuencias, pueden corresponder al origen de la replicación del plásmido; y
- un gen *parA* cuya secuencia (SEC. ID. n° 1) que presenta una homología parcial con la de los genes implicados en el reparto de los plásmidos que tiene lugar durante la división celular. Se identificaron 2 secuencias repetidas cada una de 24 bp, corriente arriba de este gen.

Para confirmar la importancia de la zona del ADN que contiene el gen *parA* manteniendo el pSM841, se construyó un plásmido de 8,8 kb sin esta zona. Los resultados demostraron una reducción de más del 50% en la estabilidad del plásmido.

ES 2 315 256 T3

Una vez identificados los genes indispensables para mantener el plásmido pSM841, se construyó un vector de 7,3 kb, que contiene:

- 1- un fragmento DraI-EcoRI de 2717 bp que comprende el operón cad;
- 2- un fragmento SspI-NcoI de 2716 bp que comprende los genes trb A y rep A;
- 3- un fragmento EcoRI-NcoI de 1857 bp que comprende el gen par A y una secuencia de clonación múltiple (MCS).

Estos fragmentos se aislaron del plásmido pSM841 por medio de la ampliación y a continuación se ligaron en presencia de T4 ADN ligasa a 16°C durante una noche.

El plásmido resultante, denominado pSM843, tiene la cartografía de restricción indicada en la figura 2.

Ejemplo 2

Aislamiento del activador constitutivo

El plásmido pSM789 (5 µg) se digirió con 40 unidades (U) de la enzima de restricción HindIII (Boehringer) en 50 µl de tampón suministrado por el fabricante.

Tras la incubación a 37°C durante 60 minutos se efectuó la desnaturalización/extracción de las proteínas añadiendo un volumen de fenol-cloroformo (1:1) y un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (23:1). El ADN se precipitó sucesivamente añadiendo 5 µl de una solución 3 M de acetato Na y 300 µl de etanol a la fase acuosa y a continuación se volvió a poner en suspensión en 10 µl de H₂O. De esta manera, se obtuvo un plásmido lineal abierto exactamente corriente arriba de la zona RBS del primer gen del operón sox (sox A).

Se utilizó el ADN linealizado (0,2 µg) para transformar 100 µl de células de DS-2 de *Rhodococcus* sp. y se seleccionaron los transformantes en placas con medio mínimo que contenían 0,04 g/l de DBT y 1% de C₂H₅OH como fuentes únicas de azufre y de carbono, respectivamente.

Se aislaron 100 clones que pueden crecer utilizando DBT. Ya que el plásmido pSM789 no pudo autorreplicarse en *Rhodococcus*, los transformantes obtenidos (aproximadamente 10² por µg de ADN utilizado) tenían que contener el operón sox dentro de su cromosoma, corriente abajo de un activador que permitía su expresión.

Con el fin de determinar si la integración tuvo lugar en diferentes puntos del cromosoma, se extrajo el ADN cromosómico de 20 clones (*Current Protocols in Molecular Biology* - vol. 1) y se digirieron con 20 U de la enzima NotI, para que exista solamente una secuencia de unión en el interior del operón sox. El ADN digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, observada mediante coloración con EtBr al 0,5% y se transfirió sobre nilón (membranas de nilón, cargadas positivamente - Boehringer) mediante transferencia Southern (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual* 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY).

Se hibridó a continuación el ADN con una sonda cuya secuencia nucleotídica corresponde a un fragmento de 770 bp del gen sox C, utilizando el procedimiento no radioactivo proporcionado por el kit DIG SYSTEM de Boehringer. La reacción de hibridación se efectuó a 68°C.

De los clones probados se observó una sola banda, con un peso molecular diferente para cada clon, que indicaba un solo episodio de integración del plásmido pSM789 en diferentes puntos del cromosoma.

Para verificar si estos clones podían desulfurar DBT en presencia de azufre inorgánico, se colocaron en medio mínimo que contenía tanto DBT como MgSO₄·7H₂O (0,20 g/l), en paralelo con la cepa DS7 de *Rhodococcus* sp. Después de 12 horas, exponiendo la placa a rayos UV a 254 nm, se observó un halo fluorescente en todos los clones recombinantes, mientras que no había halo visible en la cepa natural. Esto indicaba que la actividad de los activadores aislados no estaba reprimida por el sulfato. El clon que presentaba el halo más constante se denominó SMV110.

Ejemplo 3

Caracterización del activador contenido en SMV110

Se digirió 1 µg del ADN cromosómico del clon SMV110 con 20 U de la enzima ClaI, en 10 µl de tampón (Boehringer), a 37°C durante 16 horas. Tras la desactivación de las enzimas a 70°C durante 15 minutos, 2 µl del ADN digerido se trataron con 1 U de la enzima T4 ADN ligasa en 10 µl de tampón (Boehringer), incubando a 16°C durante 16 horas.

Se utilizó una alícuota (1 µl) de la mezcla de ligasa para transformar las células de XL1-Blue de *E. coli* hechas electrocompetitivas (Dower, W.J. et al. 1988 *Nucleic Acids Research*, 16: 6127-6145).

ES 2 315 256 T3

Se seleccionaron los transformantes en placas de medio LB con agar-agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Se analizó el ADN plásmido extraído de uno de los clones obtenidos de este modo mediante análisis de restricción. Los resultados indicaron que el plásmido estaba constituido por un fragmento de 4,5 kb, procedente del ADN cromosómico de DS-2 y el plásmido pSM789. La cartografía de este nuevo plásmido, denominado pSM839, se presenta en la figura 3.

El fragmento de 4,5 kb se amplió a continuación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (Leung, D.W., Chen, E., Goeddel, D.V.; 1989 *Technique- a Journal methods in cell and molecular biology*, 1, nº 1: 11-15) utilizando el siguiente par de oligonucleótidos:

- 1) 5' CAGTCACGAC GTTGTAAAAC GA 3' (TRANSCRITA)
- 2) 5' TGCATTTGTC GTTGTGAGT 3' (COMPLEMENTARIA)

Se realizó la ampliación en un aparato ciclador térmico 480 de ADN (Perkin-Elmer Cetus) utilizando 100 µl de una mezcla de reacción que contenía: 5 ng del ADN plásmido, 60 pmoles de los dos oligonucleótidos, dNTP 200 µM de (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) y 1 U de Taq polimerasa (Boehringer), en el tampón recomendado por el fabricante. Tras la desnaturalización durante 2 minutos a 94°C, se inició el programa cíclico, que comprende: 1 minuto a 98°C, 1 minuto a 60°C y 3 minutos a 72°C durante un total de 25 ciclos, seguido de 8 minutos a 72°C (extensión final).

El fragmento ampliado de 4,5 kb se secuenció a continuación mediante un secuenciador de ADN ABI 373 (Perkin Elmer). La secuencia y los posibles marcos de lectura abiertos se compararon con los presentes en el ADN y los bancos de proteína utilizando el motor de investigación BLAST suministrado por NCBI (Altschul, S.F., Madden, Th., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., 1997 *Nucleic Acids Research* 25: 3398-3402).

Los resultados demostraron que la integración de pSM789 en el ADN cromosómico de la cepa DS-2 había tenido lugar dentro de un gen que codifica una proteína homóloga a algunas endoglucanasas y amilasas de otros microorganismos.

Se dedujo por consiguiente que en el clon SMV110, la expresión del operón sox estaba controlada por el activador de dicho gen. Con el fin de caracterizar este activador, el punto de partida exacto de la transcripción del operón sox fue determinada por la extensión del cebador utilizando el kit del sistema 5' RACE (BRL).

Los resultados indicaron que el comienzo de la transcripción del operón sox tuvo lugar a una distancia de 622 bp de 5' del operón y que el activador estaba por lo tanto situado inmediatamente corriente arriba de dicha zona.

El análisis de la secuencia corriente arriba de la secuencia de transcripción de partida puso de manifiesto la presencia de la supuesta zona 10.

Ejemplo 4

Construcción del vector de expresión pSM846

Un fragmento de 1100 bp que contenía el activador constitutivo se amplió por medio de PCR partiendo del plásmido pSM839 utilizando los oligonucleótidos siguientes:

(i) 5' GATCGGCCGGG ATCCACGAGT GTT 3' (transcrita)
BamHI

(ii) 5' ACCCAACT GA GCTGTAA CGGCCGAGC GGCCGATGCA
HindIII HpaI SfiI

TTTTAGGTGA TGCCCGGG 3' (complementaria).
Nsi

Se digirió el fragmento ampliado con las enzimas HindIII y BamHI, se eluyó en agarosa y se insertó en las enzimas AflIII-HpaI y se ligó a pSM843, previamente digerido con AflIII y NcoI (cuya forma compatible finaliza con el anterior) en presencia de T4 ADN ligasa a 16°C durante una noche. De este modo se obtuvo un nuevo vector lanzadera de *E. coli-Rhodococcus*, denominado pSM846, que contenía el activador seguido de un MCS para la expresión constitutiva de proteínas en *Rhodococcus*. La cepa de DS-2 de *Rhodococcus* que contiene el plásmido pSM846, cuya cartografía se muestra en la figura 4, se denominó SMV112.

ES 2 315 256 T3

Ejemplo 5

Con el fin de verificar la estabilidad del plásmido pSM846 en las cepas transformadas de *Rhodococcus* después de un periodo prolongado de cultivo en ausencia de presión selectiva, se cultivaron tres clones independientes de la cepa SMV112 a 30°C, 200 rpm durante 16 horas en matraces de 100 ml, que contenían 20 ml de medio LB (10 g/l de Bacto Triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl).

Se utilizaron los tres cultivos (0,1 ml) para inocular 20 ml más de los mismos medios, y los nuevos cultivos se cultivaron a 30°C, 200 rpm durante 16 horas. Este procedimiento se repitió 3 veces más, siguiéndose el cultivo celular por un aumento de la densidad óptica medida a 600 nm (D.O. 600).

Al final de cada cultivo, se extrajeron alícuotas de los cultivos, diluidas de manera adecuada y a continuación se colocaron en placas con medio LB con agar. Se incubaron las placas a 30°C durante 16 horas y se hizo el recuento de las colonias (CFU/ml) a continuación. De esta manera se determinó que había por lo menos 35 generaciones al final del experimento.

Con el fin de determinar el porcentaje de células que habían mantenido el plásmido durante por lo menos 35 generaciones, y eran por consiguiente resistentes al cadmio, 100 colonias individuales procedentes de la colocación en placas por dilución, después del 5° cultivo de los tres cultivos, se colocaron en placas LB que contenían CdCl₂ a una concentración de 0,5 mM.

Se observó que el plásmido se mantenía en más del 90% de la población celular, demostrando de este modo una estabilidad de segregación considerable aun después de ulteriores atenuaciones en el cultivo en ausencia de presión selectiva.

Con el fin de verificar la estabilidad de la estructura del plásmido pSM846, al final de la 5ª atenuación del cultivo, se extrajo el ADN del plásmido procedente de una alícuota de los cultivos de 12 clones, utilizando el procedimiento descrito en Serbolisca *et al.* (1999). El ADN obtenido se digirió con varios enzimas de restricción para las cuales existen secuencias sencillas o dobles en el plásmido pSM846 y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa durante 2 horas a 90 V, 90 mA; se colorearon los geles con 1 mg/ml de bromuro de etidio. La observación del gel en un transiluminador de luz UV mostró las bandas esperadas según la cartografía de restricción del plásmido, demostrando que el pSM846 era estructuralmente estable en *Rhodococcus*, durante varias generaciones en ausencia de presión selectiva.

Ejemplo 6

Determinación del número de copias de pSM846 por célula

El número medio de copias del plásmido pSM846 por célula se estimó mediante PCR cuantitativa en preparaciones de ADN completo procedente de células de DS-2 de *Rhodococcus* que contenían dicho plásmido. El procedimiento se basa en la determinación de la cantidad de ADN obtenido por ampliación de un fragmento del plásmido. Esta cantidad está directamente relacionada con la concentración del propio plásmido, utilizado como molde en la reacción de ampliación.

El ADN completo se preparó según el procedimiento ilustrado en *Current Protocols in Molecular Biology* - Ausubel *et al.*, ed. Wiley Interscience apartado 2.4.1 con la modificación siguiente: para obtener una lisis celular completa se volvieron a poner en suspensión las células centrifugadas procedentes de 1,5 ml de cultivo en 567 microlitros de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) que contenía 50 µg/l de lisozima y se incubaron a 37°C durante 20 minutos antes de añadir SDS y proteinasa K según el protocolo.

Tras un tratamiento de 10 minutos con RNasa, la concentración del ADN completo se estimó en gel de agarosa y las muestras se diluyeron hasta 100 pg de ADN por microlitro.

Se efectuaron reacciones de PCR en el ADN obtenido de este modo, utilizando dos oligonucleótidos (cebadores) que aparecen en el interior del operón para la resistencia al cadmio y que presentan la secuencia siguiente:

- 5' TGGCCCGGCC GGAATTGATG GAC 3' (cebador Cd4) y

- 5' GCCGACGGCC GCGATCGTGA TCAG 3' (cebador Cd17).

La normalización se efectuó por medio de una segunda reacción de PCR en la parte del ADN cromosómico que codifica el ARN 16S de DS7 de *Rhodococcus* utilizando oligonucleótidos específicos para esta secuencia.

El número de copias del plásmido se estimó tanto en la cepa que contenía el plásmido pSM846 como en una cepa que contenía una copia única de los genes para la resistencia al cadmio integrada en el cromosoma y en la cepa DS7.

ES 2 315 256 T3

Se realizaron las reacciones de ampliación según las instrucciones del kit Syber Green de Perkin Elmer-AB.

El ADN ampliado se marcó con el marcador fluorescente Syber Green y se cuantificó con el instrumento GeneAmp 5700 de PE Applied Biosystems. Cada muestra se amplió por triplicado y los valores de la fluorescencia se compararon con curvas de calibración incluidas en cada experimento para cada par de cebadores. La cantidad de ADN obtenida ampliando con los cebadores específicos para el plásmido se corrigió a continuación para la cantidad de ADN cromosómico ampliado con los cebadores específicos para los genes 16S del ARN.

Al comparar las tres cepas ensayadas se demostró que la cepa DS7 contiene un promedio de 2 a 3 copias del plásmido de 130 kb por célula, mientras que las células de DS-2 de *Rhodococcus* transformadas con pSM846 contienen de 4 a 8 copias de plásmido por célula.

Construcción del plásmido pSM847

El objetivo del experimento consistía en obtener una cepa que contiene varias copias de genes sox bajo el control del activador constitutivo identificado.

El fragmento de ADN que contiene el activador identificado en el ejemplo 3, se amplió a partir del plásmido pSM839 por medio de PCR, utilizando los oligonucleótidos siguientes:

- 5' ATTCGAGAGT GCATATGCGG AAC 3' (TRANSCRITO)

- 5' CCATTTCTTC CAAGCTTCCG CCG 3' (COMPLEMENTARIO)

cuyo par con la SEC. ID. n° 2, en la que se introdujeron las secuencias de restricción NdeI y HindIII.

Aproximadamente 500 ng del ADN obtenido a partir de la reacción de ampliación se digirieron con 4 U de las enzimas NdeI y HindIII durante 60 minutos a 37°C y se purificaron en gel de agarosa Nusieve al 1,5% (productos de FMC). En paralelo, se digirieron 1 µg del plásmido pSM789 con 4 U de las mismas enzimas durante 60 minutos a 37°C. 50 ng del vector y 25 ng de la inserción purificados en agarosa se ligaron a continuación en presencia de 1 U de la enzima T4 ligasa. La mezcla de ligasa se utilizó posteriormente para transformar células competitivas de XL-blue de *E. coli*.

Se digirieron por separado 500 ng del plásmido extraídos de uno de los clones de *E. coli* que contenían la inserción deseada y 500 ng del plásmido pSM843 con 4 U de la enzima de restricción SspI (New England Biolabs). Se realizaron las reacciones a 37°C durante 60 minutos y a 70°C durante 10 minutos.

Se ligaron 150 ng del plásmido lineal pSM843 a continuación con 50 ng del plásmido de *E. coli* en 10 µl de tampón (Boehringer), en presencia de 1 U de T4 ADN ligasa, incubando durante 16 horas a 16°C. 1 µl de la mezcla de ligasa se utilizó para transformar células electrocompetitivas de DS-2 de *Rhodococcus*. Se colocaron en placas las células en medio mínimo en presencia de DBT y se cultivaron a 37°C durante 4 a 5 días.

Se extrajo el ADN plásmido de una de las colonias obtenidas de este modo, según el procedimiento descrito en Serbolisca *et al.* (1999, Appl. Env. Microbiol. 52:122-126) y se sometieron a análisis de restricción con enzimas para las que existen secuencias en los plásmidos de partida. El vector obtenido de este modo, que contiene el operón sox bajo el control del activador constitutivo, se denominó pSM847 (Figura 5) y la cepa SMV114 que lo contiene.

Ejemplo 8

Se cultivó la cepa SMV114 en paralelo con la cepa DS7 de *Rhodococcus* en medio mínimo más DBT con y sin 0,20 g/l de MgSO₄·7H₂O.

La electroforesis y el análisis por electrotransferencia Western de las proteínas solubles extraídas de los cultivos bacteriano demostraron que:

1. cuando las cepas se cultivan en DBT sin sulfato, SMV114 expresa cantidades mayores de proteínas Sox A, B y C que DS7;
2. en presencia de sulfato inorgánico, la DS7 de *Rhodococcus* no expresa las enzimas Sox, mientras que SMV114 expresa la misma cantidad de enzimas con respecto al cultivo con sulfato.

Se midió la actividad de desulfuración de la cepa SMV114 en las células restantes utilizando DBT como sustrato y en comparación con la de la cepa DS7 de *Rhodococcus* sp. A partir de un preinóculo en medio mínimo, se efectuaron dos inóculos para cada cepa en 100 ml del mismo medio, sin y con azufre inorgánico (0,20 g/l de MgSO₄·7H₂O, 80 mM). Los cultivos se efectuaron durante 20 horas a 30°C en matraces con protección de rompetorbellinos. La

ES 2 315 256 T3

densidad óptica de partida, medida a 660 nm, fue de D.O. 0,25 para los cultivos en MgSO₄ + DBT y 0,4 para los cultivos con DBT solo. El peso en seco se determinó por triplicado a partir de 5 ml de cultivo centrifugado a 5.000-6.000 rpm durante 10 minutos, se congeló a -80°C y se liofilizó.

5 Para la medición de la actividad de desulfuración, se extrajeron 10 ml de cultivo y se centrifugaron entre 5.000 y 6.000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Las células se volvieron a poner en suspensión en 9,75 ml de Tris·HCl 20 mM pH 7, se introdujeron en matraces de 50 ml y se incubaron en un baño agitado a 30°C durante 5 minutos. Una vez añadidos 250 µl de DBT 40 mM a la suspensión, se efectuó inmediatamente un primer muestreo (1 ml) que se extrajo con 2 ml de acetato de etilo, para determinar el producto de fondo en tiempo cero. Se tomaron
10 muestras sucesivas después de 1 y 2 horas.

Se analizaron 20 µl de la fase orgánica clarificada por HPLC en una columna cromatográfica en C18 Vydac tipo TP218-5418 en fase inversa, con un programa que comprende un caudal de 1 ml/min durante 15 minutos en 80% de acetonitrilo. La actividad específica, expresada como mg de 2HBP producida por hora por gramo de peso en seco, se
15 calculó a partir del área correspondiente al producto 2-hidroxibifenilo (2-HBP) y teniendo en cuenta el peso en seco.

Se obtuvieron valores de actividad sin azufre inorgánico correspondientes a $5 \pm 0,6$ mg/h.g tanto para la cepa natural como para SMV114. Cuando se cultivan en presencia de 0,2 g/l de MgSO₄, la cepa DS7 de *Rhodococcus* no expresó ninguna actividad de desulfuración, mientras que la cepa SMV114 mantenía su actividad.
20

Ejemplo 9

Se examinó también la posibilidad de utilizar el plásmido pSM847 en otras especies de *Rhodococcus*. Se utilizaron
25 100 ng del plásmido para transformar células electrocompetitivas de las cepas de *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Rhodococcus opacus*. En todos los casos se obtuvieron colonias capaces de desulfurar DBT, que contenían el plásmido con las dimensiones estimadas. Asimismo en este caso, por lo menos el 90% de los clones mantenían el plásmido durante aproximadamente 40 generaciones en ausencia de presión selectiva.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Vector de expresión que comprende:

- 5 (a) los genes de rep, ORF81 y trbA que codifican las proteínas implicadas en la replicación en *Rhodococcus*;
- (b) el gen parA que presenta la secuencia SEC. ID. nº: 1;
- 10 (c) un activador constitutivo de *Rhodococcus* que presenta la secuencia SEC. ID. nº: 2;
- (d) una secuencia de clonación múltiple corriente abajo del activador;
- 15 (e) por lo menos un gen que codifica un marcador genético seleccionado de entre los genes del operón cad, que proporcionan resistencia al cadmio, o los genes que codifican la resistencia a un antibiótico; y
- (f) el origen de replicación en *E. coli*.

2. Vector según la reivindicación 1, que comprende corriente abajo del activador constitutivo uno o más genes que codifican una proteína de interés.

3. Vector de expresión según la reivindicación 2, en el que las proteínas se seleccionan de entre las enzimas implicadas en la eliminación selectiva de azufre orgánico de los combustibles fósiles o de las enzimas implicadas en la producción de L-aminoácidos, enantiomorfos de compuestos quirales y ácidos carboxílicos.

4. Vector de expresión según la reivindicación 2, que comprende corriente abajo del activador constitutivo el operón sox que codifica las enzimas SoxA, SoxB y SoxC.

5. Vector de expresión según la reivindicación 1, obtenido por:

- 30 (1) construcción de un vector plásmido de clonación que comprende:
- (a) los genes de rep, ORF81 y trbA que codifican las proteínas implicadas en la replicación en *Rhodococcus*;
- 35 (b) el gen parA que presenta la secuencia SEC. ID. nº: 1; y
- (c) por lo menos un gen que codifica un marcador genético seleccionado de entre los genes del operón cad, que proporcionan resistencia al cadmio, o los genes que codifican la resistencia a un antibiótico;
- 40 (2) aislamiento de un activador constitutivo de *Rhodococcus* que presenta la secuencia SEC. ID. nº: 2; y
- (3) inserción de dicho activador constitutivo en el vector de clonación anterior.

6. Microorganismo que comprende el vector de expresión según las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo se selecciona de entre *Rhodococcus*, *Gordona* y *Nocardia*.

7. Cepa de *Rhodococcus* que comprende el vector de expresión según las reivindicaciones 1 a 4, depositada con el número CBS 102447.

8. Procedimiento para la producción de proteínas homólogas o heterólogas de interés que comprende cultivar, en condiciones adecuadas, un microorganismo que comprende el vector de expresión según las reivindicaciones 1 a 4.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la proteína se selecciona de entre las enzimas implicadas en la eliminación selectiva del azufre orgánico de combustibles fósiles y en la producción de L-aminoácidos, enantiomorfos de compuestos quirales y ácidos carboxílicos.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que las proteínas son enzimas Sox y la cepa es SMV114 CBS 102447 de *Rhodococcus*.

11. Procedimiento para la eliminación del azufre orgánico de los combustibles fósiles **caracterizado** porque utiliza un microorganismo seleccionado de entre *Rhodococcus*, *Gordona* y *Nocardia* que comprende el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene el operón sox corriente abajo del activador constitutivo.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el microorganismo es SMV114 CBS 102447 de *Rhodococcus*.

13. Activador constitutivo de *Rhodococcus* que comprende la secuencia SEC. ID. nº: 2.

Fig.1

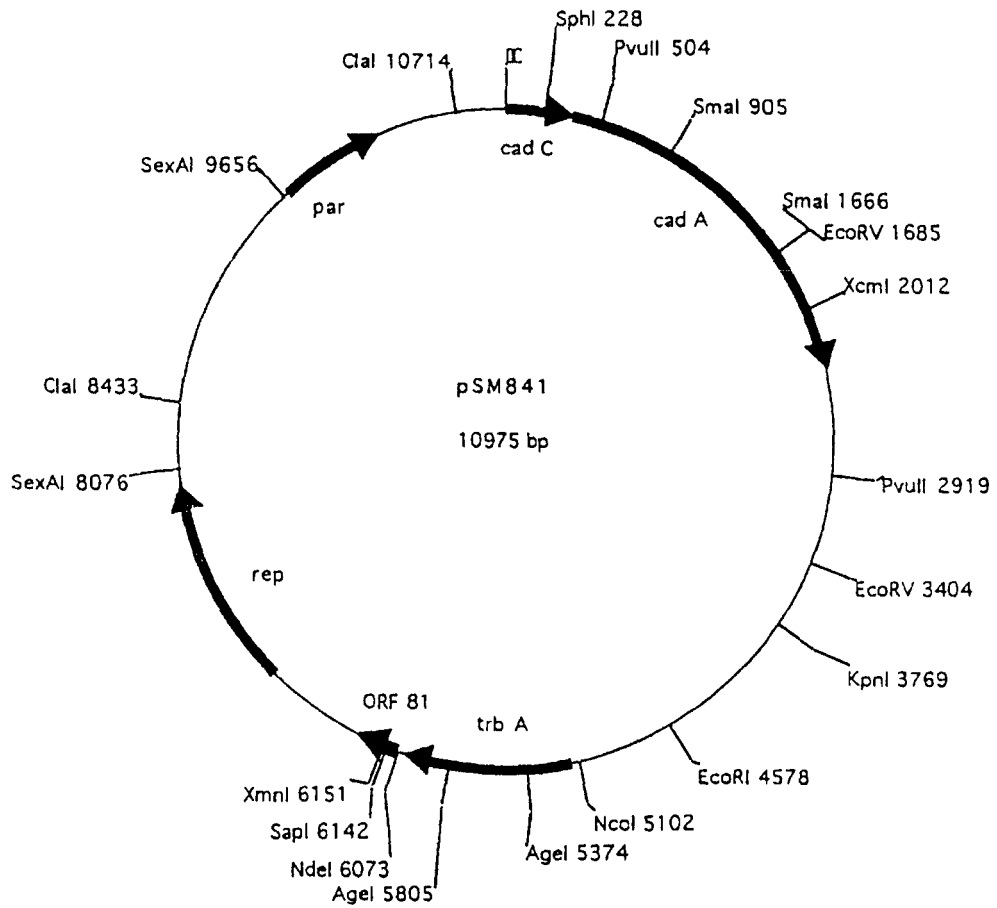


Fig.3

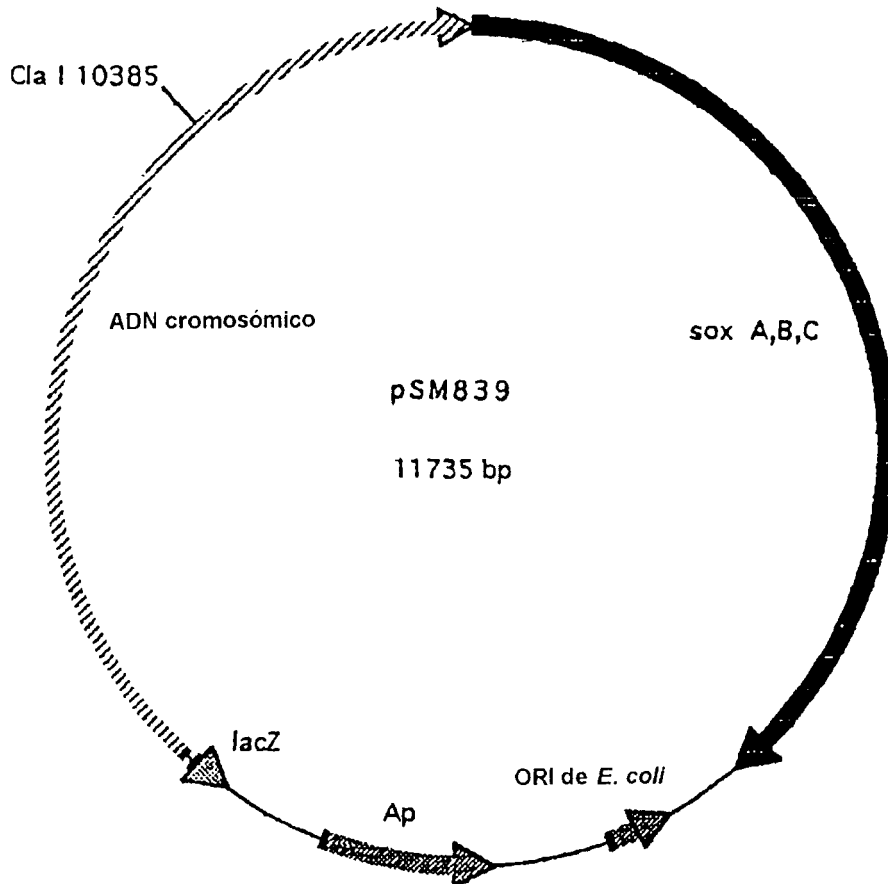


Fig.4

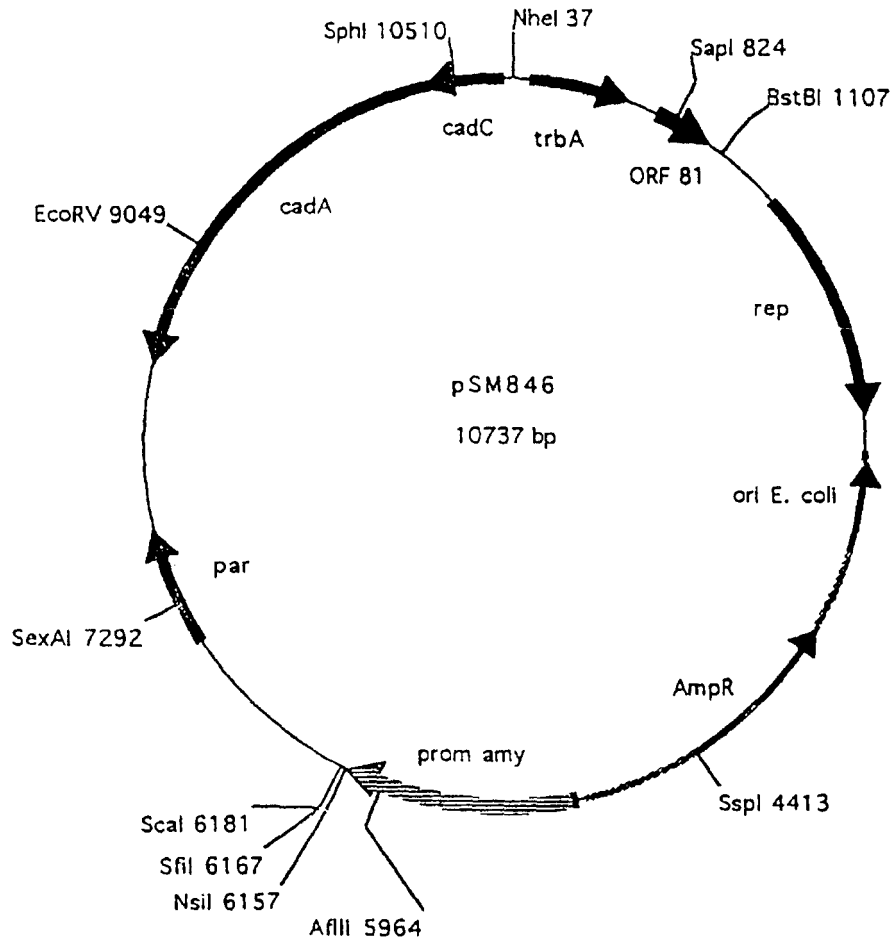
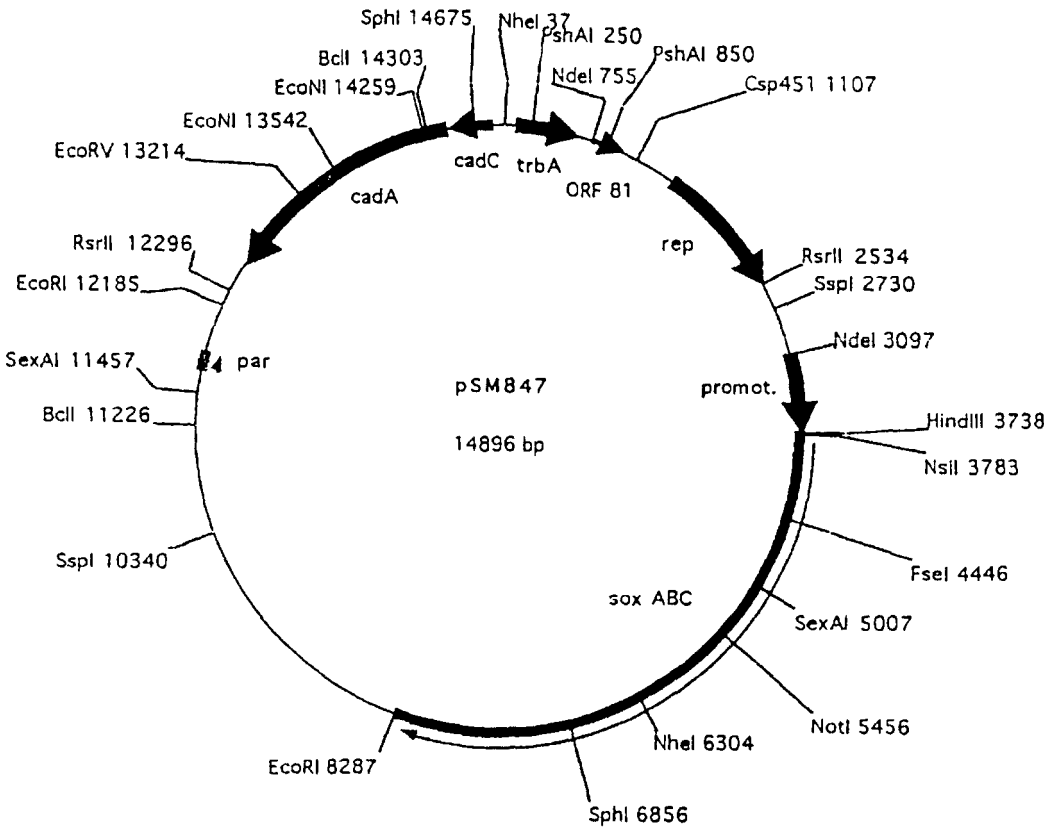


Fig.5



ES 2 315 256 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID nº: 1

TIPO SECUENCIA: Nucleótido

LONGITUD DE SECUENCIA: 2290 pares de bases

TIPO DE FILAMENTO: Único

TOPOLOGÍA: Lineal

10

ATCGATTTTT CCGCCGGCGG CGCCGCCGCA TCCCACGCTG CCGTGAGTCC 50

GTCCAAAGCT CGCAGCATCG ACGGGTGGTA CTTACGCAAC GCTGCCTGGC 100

15

TGAACCCGGC GTTGAGGATG ATGTGCGCCT TCTGCCAGTT GGGTTCGGAG 150

TTGAAAGCGG TGAAAAGGCC GTCCTCCGCG ACTGCCCGCA GCTTTCGGAT 200

20

CGGCAGACC ACCGATTTTCG CCCACAATGC CTCGTTGTTG ACCTCGGCGA 250

CCAGCTCCAC CCCGGAGACC ACGGTCAGTC GGTGATTGAT GATCTTGCGC 300

25

TCGAAGATCG GCCCCAGCCT CGAAGCCATG ACCATTCCT TCTGGACAGG 350

CTTCACCGAG TCGACGCTGA GCAAGTCCC CAACACAGGC AGCCGCCAGG 400

30

ACGGCGACGG AATCGACTCG AACTCAAGGA CTGGTTTGAC CGCGACCTCG 450

CTGGTGGGTG TCTCACTGCT CGGATACGGG CACTTGTCGG AAGACATGGT 500

35

GGACAGTCTT GCATCAGTTC CGGACTAGAT GCCGACTCGA CGCAAAATGG 550

40

45

50

55

60

65

ES 2 315 256 T3

GCGATGGAAC GCAAAGCCGC CATCCAGGAT GGAGCAGCGC GCCAAGAACC 600
 ATGCAAACCA GCGCTACTTG CGCAGACAAG CGGAAGTCGA ACGTGTCTGT 650
 5 GTTCCCCCTC ATCTTCACTT CCCCCTGCT CTACGGAACC TTCTGAGCTG 700
 GCATTTTGCA TGATTTCCGA GCCCCGGAAC CAGCTATAACA GTTTTACGGC 750
 10 AAACCGGGAA ACTGGAAAAC CGTATAGACG GCTACCCGGC AAAACGATAT 800
 GCTGTCTATA CGGATAGACG GGAAACCGGA TGCCTGGGAA ACTGGCTAAG 850
 15 TGTGTATACG GCTAACTGGC AAGCCGGGAA GCTGTTTTAC AGGTAAGTGT 900
 TTTTACAGCT TTCCGGCAA A CCGGGAAACT GTAAAACCGG CAAACTGGGA 950
 20 ACTGTAAAAC CGGCAAAC TG TAAACAAGCG AAAGGGCCCT TCTCGATGAT 1000
 CATCAGTCTC GTCAACACCA AAGGCGGAAC GGCCAAGACG ACGAGCGCGA 1050
 25 TCTACCTTGC ACTCGCGTTT CATAATCGGG GGAGGAAGGT TGTCGTCCTC 1100
 GACTTGGATA AACAGGGTTC AGCAACTGAC TGGGCTGACC GCGCCACAGA 1150
 30 GGCCGGAGAT CCACTCCCGT TCCCAGTGCA TGTCGTGAAC ATGAAACGGC 1200
 TGGTGAAGTA CGCCACCGAT GGCGATGACC AGGTAGTAAT CATCGACACC 1250
 35 CCGCCCGGTG ACGGGCAAGT TATCGACGCT GCAATCGGGG CGTCCAACCTT 1300
 CGTCATAATG CCCACGGCGG CTACAGGACT CGACACCGCC AGGGTCTGGG 1350
 40 AGACGCTGCC CTCGGTGCAG GGCCGCCTTC CCTACGGAAT CCTCATTACC 1400
 TCCGCACGTC TCGGAACGAA CCTGCTTGAA GATGCCAAGG CAGCGTTCGA 1450
 45 CAGCAACGAC GCAGCCCGAT TCGACACCGT CATCCCCATG CGCGAGCGCA 1500
 TCCGGTCAAC ATTCCGTACT ACCCCCAAGC ACGACGAAGG GTATTCCGAC 1550
 50 GTCGTGACG AGATCACAGA GGCGCTGACA GCATGAGCAT CCCAAGGCA 1600
 AAGACGACAC CGACGCTCGG GCCCCGCAAG TCCGCGCCAC CGATCGCGAC 1650
 55 GCCCTCAGTG ACGTCCAGCT TCGTCGAACC GGACGCAGAC CGCACGAAAC 1700
 TCACCGTCCA GATCGACGCT GAACTGCACC GACGCTTCAA AGCTGCTGTT 1750
 60 GCAGGAAGCG GCAAGAAGAT GCGCGACGTG GTCGAGGAAA TGATCGAGCA 1800

65

ES 2 315 256 T3

	GTGGACCGAC GCGAACAGTG GTCGCTCATA ACTCGGTGAC GCTGTTACGC	1850
5	AAAACCAAAG GGAGCCTCGC CGGTTGCACC CGACGAGGCT CCAGACCGGG	1900
	AAACCCCTGG AAGGAAGAAA CCCAGTCATG ACCGACTTTA GCCTTCGGGC	1950
	AGCTCGTATT CAGCTAGGCG CATTGCTCGC CGCACTGGCA CTCGCGATCG	2000
10	TCATTGCGCT CGGTATCACC ACCGGCGCAT TCGTACTTTC CTTCGCCGTG	2050
	CAACGCGACC TTGCACGGCA AGCACTGATC CCCGAACACC TGACCTGGAT	2100
15	CTTCCC GGCG ATTGTGCGACA GCGCTATCCT CGGCGCCACG ATCGCCATCG	2150
	TCATCATCAG CAAGCTCAAC ATGAACAAGC GCGACAGAGG CTTCTACATC	2200
20	GCACTCGCCG TCAGCGTTGT CGTGATCAGC ATCCTCGGAA ACGCGTACCA	2250
	CGCCTATCAC GCAGCAATCG CCGCGCAGGA GTCGATCGAT	2290

25 SEC ID nº: 2

TIPO DE SECUENCIA: Nucleótido

LONGITUD DE SECUENCIA: 1355 pares de bases

TIPO DE FILAMENTO: Único

30 TOPOLOGÍA: Lineal

PROPIEDADES: Promotor

35	ATCGATCGGC CGGGATCGAC GAGTGTGTC ATTTACCGA GCACTTCGCC	50
	ACCGCGGATC TGACGGCGCC GATCTCGGTG ATGGAGTCCT GGTCGGCGCT	100
40	TCCACCTGTG GTCTCGAGGT CGACGACGAC AAACGTCGTT TCGCTCAGCG	150
	GTGTGTCCAG CTCGTGGAAG CTCAGTTGCC GCCCGACGTC GAACTTCTCC	200
45	CCGTCGGAGA ACGGGGACGG AGACGGAAAT TCTCGGGCCG AGGCGGGACT	250
	CACACCGCAG ACAGTAGAAG GACCCCCGA CACGAATTCG AGAGTGCATA	300
50	CGCGGAACCC GGCTCACTCC GACTTCCATT GGGAAAGCAA CGGATTGACC	350
	CCCGACAAA GTACGAGAGA CGAGGATCAC ACTTGCGGTG GGAACTCGCG	400
55	AATGCGGACT CCTACCTACT TACCGGTAGG GCGATTCTGT AGGGTGTGTC	450

60

65

ES 2 315 256 T3

TACGGCGATC AGTCGCCGAA ACCGCCTGAT TGATCGAAAC GGGTTCTAGT 500
 TTCAAGTAAT CGGCGTTGAA CTGCATGGAA GATCGGATTG TCGGGTTTGG 550
 5 TGACCCTTGC CAGTGGGTAG CAAGCGCAGG TTTGCGGGCC AGGTGAGCCT 600
 CGCCGAACAG ACCTGTTGTT ATCTCTTCGT GACCCGTCCG GCGTATCGCG 650
 10 GCGCGGGCAG CATGATTTCC GCGGAATCGG GCGCGATTGT CACGAAGCGG 700
 TCGACATCGT CGCGATCATT TCGTAACCTT CCTGAGACCT AACGAAGTCT 750
 15 TGCCGGACCA AACAGGACCG GCATCGTCAG GAACCGCCTA ATCGGGATCT 800
 CCGCGAGGAA CCCGAACCGG GAACCCAAGT TTCCACTGGG GTGAATCCCG 850
 20 CCTGGGGTGC AGCACGCATG ATCGCTGCGG ACCACGCGGG TAGGGCTGAT 900
 CTTCCCAGCC CGAACCCGTC AGCTAACTCG GTCGGCGGAT GAATGGAAGA 950
 25 AATGGAGCAC CCCTTAAGTG GCGTCACAGA GTTTC AAGCG TTCAGCGCAG 1000
 TTGGCAGTAG CCGGCGCGCT CGCAGTCGGA GCATTTGCTG CAACCGCTGC 1050
 30 ACCTGCCTCG GCAGACCCCA TCACCATCCC CGGCGTCGGC ACCTTCGAGG 1100
 TTCCGGGCGC TTCTATTCTT CAGTTGCCGG TCATCCCGGG CATCACCGAC 1150
 35 ATCGCACCGG CCGCTCCGGC CGCTCCCATC TCCAGTGTTG GTGAGCAGGC 1200
 AGTTCGCGCC GCAGAGAGCA AGCTGGGCTC CCCGTACGTG TACGGCGCAT 1250
 40 CGGGCCCGGA CGCATTGAC TGCTCCGGTC TGGTCCAGTG GGCATACAAG 1300
 CAGGCTGGTC TGAACCTGCC TCGCACGAGC TACGACCAGG CCGCAGCCTA 1350
 45 AATTT
 1355
 50
 55
 60
 65

ES 2 315 256 T3

SEC ID nº: 3

TIPO DE SECUENCIA: Nucleótido

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 2806 pares de bases

5 TIPO DE FILAMENTO: Único

TOPOLOGÍA: Lineal

PROPIEDADES: Operón

```

10   AGATGCCACT GCGCCATTCC TGGTGAGGTA CGTCGGCCGA CCACCGTTCG 50
      GCTGGCGTAC CACATCCACT TTCAAGTCCT GCACATCCGC ACCTTTTTTA 100
15   AATCGCCAAC TATCGCTATC ATCGTTATAT GACGATAAAT AAAGAGTCGG 150
      GGTGCCCTCGC CGCAACCGGC AGCGGGTCCA GCTTGGATGC GGCAGTGGCC 200
20   CTGTTCCACA GTCTCTCGGA CGGCACCCGA TTGTGATCG TGCGCCGTCT 250
      CGCCGAAGGA GAGGCACGGG TTGCGGATTT GATCGGCGAA CTCGGCCTCG 300
25   CCCAGTCGAC GGTGTCCGCA CATGTCGCAT GCCTACGTGA TTGCGGTTTG 350
      GTCGACGGCA GACCGGAAGG TCGGCAGGTG TTCTACTCGC TGGCCCGGCC 400
30   GGAATTGATG GACCTACTCG CCTCGGCGGA GACGCTCCTT GCCGCGACAG 450
      GGAACGCGGT TGCCCTGTGC CCGAATTACG GCACCGACAT CGGAGATAGC 500
35   CGTGAGTGAC GCGTGCGGCT GCGGCCACGA CGAACCCCGT GCCGAGGGCG 550
      AGGAAGAACA CGGGCCCGAA AAGTGGTGGC AGGTTACCGA GATCCGGGGC 600
40   GCTGCAGCTG CGGGCGTGCT GCTGATCGCG GCCCTGACAG TCGGGCTGGC 650
      CGGCGGACCT GATGCGCTCG GGATCGGCCT CGAAGCGGGC GCGCTGATCA 700
45   TTGCCGGCTA CACCTTCGTA CCGTCCACCC TCACACGCCT GGCCAAGGGC 750
      AAAATCGGGG TCGGCACCCT GATGACGATC GCGGCCGTCG GCGCGGFACT 800
50   GCTCGGCGAG GTCGGCGAAG CAGCCATGCT CGCATTCTTG TTTGCGATCA 850
      GCGAGGGACT CGAGGAGTAC GCGGTCACCC GCACCCGCCG TGGCCTGCGC 900
55   GCGTTACTGT CCCTGGTCCC GGACACCGCG ACAGTGCTCC GCGACGGCCG 950
      GGAGGAAACC GTCCACCCT CGGACCTCGA GCTCGGTGAG GCCATGATCG 1000
60   TCAAGCCCGG GGAGCGGATC GCCACCGACG GTGTCATTCTG CGCCGGCCGC 1050
      ACCGCCCTGG ACACCTCCGC GATCACC GGA GAATCGGTGC CCGTCGAAGC 1100
65   CGGTCCCGGC GACGAGGTAT TCGCCGGGTC GATCAACGGC ACCGGCGTCC 1150
      TCGAAGTCGA GGTACCGCA GAGGCGCAGG ACAATTCGCT GGCGAAGATC 1200
  
```

ES 2 315 256 T3

GTGCGGATCG TCGAAGCTGA GCAGTCCCGC AAGGGCGAGG CGCAACGCCT 1250
 CGCCGACAAG ATCGCCAAAC CGCTGGTTCC GGGCGTAATG ATCGTCGCCG 1300
 5 CGGTTATCGC CGCGGTCCGC AGCGTGCTCG GTGATCCGCT GGTGTGGATC 1350
 GAACGAGCCC TGGTGGTACT GGTCGCCGCG TCCCCGTGCG CGCTGGCCAT 1400
 10 CGCGATAACC GTCACGGTCG TCGCCGCAAT CGGCGCAGCA TCCAAGCTCG 1450
 GTGTCTTGGT CAAGGGCGGC GCAGCCCTCG AAGCGCTCGG CAGGATCCGC 1500
 15 ACCATCGCAT TGGACAAGAC CGGCACCCTC ACCCGCAACC AACCCGCCGT 1550
 GATCGACGTC GCGACCGCGA ACGGCGCCAA CCGCGGTGAC GTTCTCGCGG 1600
 20 TGGCCGCAGC GTTGGAGGCA CGCAGCGAGC ACCCGCTCGC TCGCGCGATT 1650
 CTCGCCGCCG TCGAGGACTA CACACCCGCT GATGACGCGG ACGCAGTCAT 1700
 25 CGGTGCAGGC CTGACCGGCT ACATCGACGG CATCCCCGTC CGGCTCGGTC 1750
 GACCAGGCTG GATCGACCCG GGGCCACTGA CCGGGGATAT CGAACGAATG 1800
 30 CAGCACGCCG GCGCCACTGC GGTCTGATC GAACGCGCCG GAACCGTGAT 1850
 CGGGGCGGTC GCCGTCCGCG ACGAACTCCG CCCGGAAGCA CGCGAAGTGG 1900
 35 TCACCGAACT ACGCCGCGGC GGCTACACCG TCGCGATGCT CACCGGCGAC 1950
 AACGAGCGCA CTGCCC GCGC TCTGGCCGCC GATGTCGGCA TCGACGACGT 2000
 40 GCACGCCGAT CTGCGCCCGG AGGACAAGGC GCGCATGTG GAGACCTTGC 2050
 GTGCGAGCCG ACCGACGGCG ATGGTCGGGG ACGGTGTCAA CGATGCCCCC 2100
 45 GCCCTGGCCA CCGCCGATCT GGGTATCGCG ATGGGTGCGA TGGGAACCGA 2150
 CGTCGCCATC GAGACCGCCG ATGTCGCTTT GATGGGCGAG GACCTGCGGC 2200
 50 ATCTTCCTCA GGCTCTGCAG CACGCGCGAC GATCGCGGTC GATCATGTTG 2250
 CAGAACGTCTG GCCTGTCTTT GGCATCATC ACCGTTCTGA TGCCTCTGGC 2300
 55 TCTGTTCCGGT GTACTCGGAT TGGCTGCGGT CGTGCTCGTC CACGAGGTCG 2350
 CCGAGATCGT CGTCATCGCC AACGGGGTGC GCGCCGGGCG TACCCGAAGT 2400
 60 CTGGCTGCTG TACCGCAGTC GACCAGGGCG TCCGAGCCGG CCACGGTAGT 2450

65

ES 2 315 256 T3

	ACGGCGATGA CATCTGCCGC CAGCTCCGGG TCATCATCGG TGTCCGTGGT	2500
5	CGGAATGCGT CGCGGCCGGG GTGTTCTCGT CATACTCGCA GGTGCCTTGG	2550
	CTGCGGTCGC GCTGCTCCTC GACCCGGTGG CACGTGGCGC GCTGTCCGGT	2600
10	GGGCAGGTAG TCGATTTCCG GGTCTTGCAA CTGCGATTGG CCTACAACAG	2650
	CGGTGTCGCG TTCAGTCTCG GTGACCAGCT CCCACAGTC GTCGTTCTCG	2700
15	CCGGCACCGC TGCCCTCACC GCCGCGATCG GTGTGTTTCGC CTGGCGCACA	2750
	GCATCTGAGC GTCCCGTACT CCAGACCATC GGGCTGGCCG CGATCACGGC	2800
20	CGGTACC	2806

SEC ID nº: 4

TIPO DE SECUENCIA: Nucleótido
 LONGITUD DE SECUENCIA: 22 pares de bases
 TIPO DE FILAMENTO: Único
 TOPOLOGÍA: Lineal
 PROPIEDADES: Cebador

CAGTCACGAC GTTGTA AAC GA

SEC ID nº: 5

TIPO DE SECUENCIA: Nucleótido
 LONGITUD DE SECUENCIA: 20 pares de bases
 TIPO DE FILAMENTO: Único
 TOPOLOGÍA: Lineal
 PROPIEDADES: Cebador

TGCATTTGTC GTTGTTGAGT

SEC ID nº: 6

TIPO DE SECUENCIA: Nucleótido
 LONGITUD DE SECUENCIA: 23 pares de bases
 TIPO DE FILAMENTO: Único
 TOPOLOGÍA: Lineal
 PROPIEDADES: Cebador

GATCGGCCGGG ATCCACGAGT GTT

SEC ID nº: 7

TIPO DE SECUENCIA: Nucleótido
 LONGITUD DE SECUENCIA: 58 pares de bases
 TIPO DE FILAMENTO: Único
 TOPOLOGÍA: Lineal
 PROPIEDADES: Cebador

ACCCAACACT GAGCTGTTAA CGGCCGGAGC GGCCGATGCA
TTTTAGGTGA TGCCCGGG

ES 2 315 256 T3

SEC ID nº: 8

TIPO DE SECUENCIA:: Nucleótido
LONGITUD DE SECUENCIA: 23 pares de bases
TIPO DE FILAMENTO: Único
TOPOLOGÍA: Lineal
PROPIEDADES: Cebador

5

10

TGGCCCGGCC GGAATTGATG GAC

SEC ID nº: 9

TIPO DE SECUENCIA:: Nucleótido
LONGITUD DE SECUENCIA: 24 pares de bases
TIPO DE FILAMENTO: Único
TOPOLOGÍA: Lineal
PROPIEDADES: Cebador

15

20

GCCGACGGCC GCGATCGTGA TCAG

SEC ID nº: 10

TIPO DE SECUENCIA:: Nucleótido
LONGITUD DE SECUENCIA: 23 pares de bases
TIPO DE FILAMENTO: Único
TOPOLOGÍA: Lineal
PROPIEDADES: Cebador

25

30

ATTCGAGAGT GCATATGCGG AAC

35 SEC ID nº: 11

TIPO DE SECUENCIA:: Nucleótido
LONGITUD DE SECUENCIA: 23 pares de bases
TIPO DE FILAMENTO: Único
TOPOLOGÍA: Lineal
PROPIEDADES: Cebador

40

45

CCATTTCTTC CAAGCTTCCG CCG

50

55

60

65