



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106459977 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201680000214.6

(72)发明人 李承彬 裴贤爱 李智惠 梁荣烈

(22)申请日 2016.01.15

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(30)优先权数据

11105

10-2015-0014587 2015.01.29 KR

代理人 张文辉

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2016.04.15

C12N 15/113(2010.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12N 15/31(2006.01)

PCT/KR2016/000444 2016.01.15

C12N 15/77(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

C12P 13/04(2006.01)

W02016/122146 EN 2016.08.04

(83)生物保藏信息

KCCM11591P 2014.10.23

(71)申请人 CJ第一制糖株式会社

权利要求书1页 说明书11页

地址 韩国首尔市

序列表5页

PCT/R0/134表1页

(54)发明名称

新的启动子及其用途

(57)摘要

提供了新的启动子和使用其生成目标产物的方法。

1. 一种启动子,其包含以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。
2. 一种表达调节序列,其包含权利要求1的启动子。
3. 一种载体,其包含权利要求2的表达调节序列和与所述表达调节序列可操作连接的靶基因。
4. 一种宿主细胞,其包含权利要求3的载体。
5. 根据权利要求4的宿主细胞,其中所述宿主细胞是属于棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 或埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的细菌细胞。
6. 一种生成目标产物的方法,所述方法包括:
培养权利要求4或权利要求5的宿主细胞;和
从所述宿主细胞或包含培养的宿主细胞的培养基中回收所述目标产物。
7. 权利要求6的方法,其中所述目标产物是氨基酸。

新的启动子及其用途

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年1月29日在韩国知识产权局提交的韩国专利申请No.10-2015-0014587的权益,其公开内容通过提及完整并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 1. 领域

[0005] 一个或多个例示性的实施方案涉及新的启动子和使用其生成目标产物的方法。

[0006] 2. 相关技术的描述

[0007] 为了通过使用微生物以高产率生成目标产物,例如L-氨基酸、有机酸或核酸材料,需要选择性控制与微生物中的许多代谢过程相关的基因的表达。具体地,需要增强参与目标产物的生物合成途径的靶基因的表达,并且例如可以进行表达调节序列的修饰。表达调节序列的此类修饰可以包括例如替换天然启动子为强启动子、天然启动子的修饰、或Shine-Dalgarno (SD) 序列的修饰。将天然启动子替换为强启动子已经最多地使用,并且在这点上,认为开发有用的启动子是必要的。

[0008] 然而,本领域中已知的强启动子是有限的,并且可能仅在有限的微生物中表达。在一些情况中,强启动子可能不能在如期望的各种强度水平上展现出强的表达效应。

[0009] 源自大肠杆菌的tac启动子在本领域中作为强启动子是广泛已知的。在棒杆菌属的情况中,已经通过修饰天然启动子开发出新的启动子(参见Gene,102,93-98,1991; Microbiology,142,1297-1309,1996)。例如,报道了源自产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniogenesis*)的启动子比源自大肠杆菌的tac启动子具有高约10%的活性(参见Biotechnol.Lett.25,1311-1316,2003)。另外,作为源自产氨棒杆菌的强启动子,具有各种强度水平的Pc j1至Pc j7启动子已经得到开发,并且具有强启动子活性,其是tac启动子活性的至少10倍(参见KR 10-0620092)。另外,报道了源自黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)MJ-233 (FERM BP-1497)的启动子比tac启动子具有更强的活性,但是在与属于短杆菌属(*Brevibacterium*)的微生物不同的微生物中其表达具有困难(参见US 5,593,781)。

[0010] 在这点上,在本发明构思的发明人探索可以在多种不同微生物中具有各种强度水平的包括启动子序列的区域时,发现根据本发明构思合成的新的启动子在多种不同微生物中表达,并且比本领域中已知的现有启动子的那些表达效应展现出强得多的表达效应,从而完成本发明构思。

[0011] 发明概述

[0012] 一个或多个例示性实施方案包括新的启动子、包含新的启动子的表达调节序列、包含新的启动子的载体、包含载体的宿主细胞、和使用宿主细胞生成目标产物的方法。

[0013] 发明详述

[0014] 现在将详细参考实施方案,其例子在附图中显示,其中自始至终,类似的参照数字指类似的元件。在这点上,本实施方案可以具有不同的形式,并且不应解释为限于本文中列出的描述。因而,下文通过参考附图仅描述了例示性的实施方案以解释本描述的各方面。如本文中使用的,术语“和/或”包括一个或多个关联列出项的任何和所有组合。

[0015] 别的方面在后面的描述中部分列出,并且从描述看部分会是明显的,或者可以通过实施呈现的实施方案获悉。

[0016] 根据一个或多个例示性的实施方案,提供了包含以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的启动子。在本发明构思中,所述启动子命名为“ P_{o2} 启动子”(在下文中称为“ P_{o2} ”)。

[0017] 如本文中使用的,术语“启动子”指下述DNA区域,其与RNA聚合酶组合以容许启动与所述启动子可操作连接的基因的转录,并且可以位于mRNA转录的启动位点的5'端。

[0018] 可以根据几种技术的目前研究(诸如定向进化技术或定点诱变技术)在一定程度上修饰如本文中使用的具有启动子活性的多核苷酸。例如,与以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列具有70%或更多,80%或更多,90%或更多,或95%或更多的同源性的启动子也包括在本发明构思的范围内。

[0019] 如本文中使用的,术语“同源性”指多核苷酸序列间的序列同一性的程度(以百分比表示)。在本说明书中,与给定多核苷酸序列相同的序列或与给定多核苷酸序列具有相似活性的序列的同源性按照“%同源性”表示。例如,可以通过使用标准软件(例如BLAST 2.0)计算诸如得分、同一性和相似性等参数来测定多核苷酸序列的同源性。或者,可以通过根据在限定的严格条件下进行的杂交方法比较序列鉴定多核苷酸序列的同源性。可以考虑本领域技术人员公知的方法(参见下文,于Sambrook等,1989),确定杂交方法的限定且适合的条件。

[0020] 根据一个或多个例示性的实施方案,提供了控制靶基因表达的表达调节序列,其包含以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0021] 如本文中使用的,术语“表达调节序列”指用于表达编码序列的DNA序列,其与宿主生物体中的DNA序列可操作连接。此类表达调节序列可以包括启动转录需要的启动子、用于调节转录的操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列、和用于调节转录和翻译终止的序列。例如,适合于原核生物的表达调节序列可以包括启动子、操纵子序列、和核糖体结合位点,但是不限于此。表达调节序列包括本发明构思的 P_{o2} ,若必要的话,本领域技术人员可以构成如上文描述的表达调节序列。

[0022] 根据一个或多个例示性的实施方案,提供了包含表达调节序列和与所述表达调节序列可操作连接的靶基因的载体。

[0023] 如本文中使用的,术语“可操作连接”指在控制靶基因的表达调节序列(例如启动子)和其它核苷酸序列之间的连接。在这点上,所述表达调节序列可以能够控制其它核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0024] 如本文中使用的,术语“载体”指下述DNA产物,其包含与适合于表达靶蛋白的表达调节序列可操作连接的编码靶蛋白的多核苷酸的碱基序列。另外,可以将多个核苷酸序列与载体键合(bonded)或重组,从而可以将具有合适的3'非翻译序列的选定基因的DNA序列和启动子导入细胞中。载体可以用于在合适的宿主细胞中转化,然后可以复制载体,不管宿主的基因组如何。或者,载体可以整合入宿主细胞的基因组中。另外,载体可以包含启动子或其变体和靶基因,并且此外可以包含复制起点、启动子调节位点、核糖体结合位点、转录终止位点、选择标志物、或其组合。

[0025] 本发明构思中使用的载体没有特别限制,只要它可以在宿主细胞中复制,并且可以使用本领域中可用的任何载体。本领域中通常使用的载体的例子包括天然或重组质粒载

体、粘粒载体、病毒载体、和噬菌体载体。噬菌体和粘粒载体的例子包括pWE15、M13、 λ MBL3、 λ MBL4、 λ IXII、 λ ASHII、 λ APII、 λ t10、 λ t11、Charon4A、和Charon21A，并且质粒载体的例子包括基于pBR的、基于pUC的、基于pBluescriptII的、基于pGEM的、基于pTZ的、基于pCL的、和基于pET的载体，但是载体不限于此。

[0026] 靶基因指编码待过量表达的产物的基因。例如，靶基因可以是参与选自下组的产物生成的基因：氨基酸（例如L-氨基酸）、有机酸及其组合。详细地，靶基因可以是编码参与氨基酸生物合成的酶的基因、编码参与有机酸生物合成的酶的基因或编码参与输出目标产物的蛋白质的基因，但是不限于此。

[0027] 根据一个或多个例示性的实施方案，提供了包含载体的宿主细胞，其中载体包含控制靶基因的表达调节序列，并且包含具有以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的启动子和与所述表达调节序列可操作连接的靶基因。

[0028] 宿主细胞没有特别限制，只要用作宿主细胞的微生物能够导入载体，所述载体包含控制靶基因的表达调节序列，并且包含具有以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的启动子和与所述表达调节序列可操作连接的靶基因。宿主细胞可以是原核细胞和真核细胞两者，但是在例示性的实施方案中，可以是原核细胞。例如，宿主细胞可以包括属于埃希氏菌属、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、沙雷菌属 (*Serratia*)、普罗威登斯菌属 (*Providencia*)、棒杆菌属、和短杆菌属的微生物的菌株。例如，宿主细胞可以是属于棒杆菌属或埃希氏菌属的微生物的菌株。例如，宿主细胞可以是属于大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、热产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium thermoaminogenes*)、黄色短杆菌或乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) 的微生物的菌株。

[0029] 可以通过如本领域中描述的那样根据宿主细胞选择合适的技术来进行载体的导入。可以通过例如电穿孔、热休克、硫酸钙 (CaPO_4) 沉淀、氯化钙 (CaCl_2) 沉淀、微注射、聚乙二醇 (PEG)、DEAE-右旋糖苷法、阳离子脂质体法、乙酸锂-DMSO法或其组合进行载体的导入，但是不限于此。

[0030] 根据一个或多个例示性的实施方案，提供了生成目标产物的方法，所述方法包括：在培养基中培养宿主细胞，其中宿主细胞包含包括表达调节序列和与所述表达调节序列可操作连接的靶基因的载体，所述表达调节序列包含具有以SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的启动子；并且从宿主细胞或包含培养的宿主细胞的培养基中回收所述目标产物。

[0031] 所述目标产物可以选自下组：氨基酸（例如L-氨基酸）、有机酸和其组合。如本文中使用的，术语“氨基酸”或“L-氨基酸”一般指构成活体的蛋白质的基本单元，其中氨基酸基团和羧基基团与同一个碳原子连接。氨基酸可以选自下组：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、双碘酪氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸、羟基脯氨酸及其组合，但不限于此。如本文中使用的，术语“有机酸”指具有酸性的有机化合物，并且例如可以包括具有羧基基团和磺酸基基团的有机化合物。有机酸可以包括例如乳酸、乙酸、琥珀酸，丁酸，棕榈酸，草酸，酒石酸，丙酸，己烯酸 (hexenoic acid)、癸酸、辛酸、缬草酸 (valeric acid) 或柠檬酸，但不限于此。

[0032] 可以根据本领域中已知的典型方法进行宿主细胞的培养。用于培养宿主细胞的培养基可以包含作为糖源的糖和碳水化合物，诸如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉和

纤维素;油和脂肪,诸如大豆油、向日葵油、蓖麻油和椰子油;脂肪酸,诸如棕榈酸、硬脂酸和亚油酸;醇,诸如甘油和乙醇;和有机酸,诸如乙酸,个别或作为混合物,但是不限于此。用于培养宿主细胞的培养基可以包含作为氮源的蛋白胨、酵母提取物、肉膏、麦芽抽提物、玉米浸出液(maize steep liquor)、大豆粉和尿素,或无机化合物,诸如硫酸铵、氯化铵、硫酸铵、碳酸铵或硝酸铵,个别或作为混合物,但是不限于此。用于培养宿主细胞的培养基可以包含作为磷源的磷酸二氢钾或磷酸氢二钾,或其相应的含有钠的盐,但是不限于此。用于培养宿主细胞的培养基可以包含生长需要的金属盐,诸如硫酸镁或硫酸亚铁,但是金属盐不限于此。另外,在培养宿主细胞期间,可以对培养基添加必需的生长物质,诸如氨基酸和维生素,或合适的前体。此类材料可以在宿主细胞的培养期间以合适的方式添加到培养基,并且例如可以以分批或连续方式添加。

[0033] 此外,在宿主细胞的培养期间,可以以适合于调节培养基的pH的方式对培养基添加化合物,诸如氢氧化铵、氢氧化钾、氨水、磷酸和硫酸。另外,在宿主细胞的培养期间,可以使用消泡剂(诸如脂肪酸聚乙二醇酯)以防止泡沫的产生。为了维持培养基的需氧条件,可以将氧气或含有氧气的气体(例如空气)引入培养基中。在这里,培养基的温度的范围可以是约20℃至约45℃,例如约25℃至约40℃。另外,可以继续宿主细胞的培养,直到实现期望量的目标产物,并且在这点上,可以继续宿主细胞的培养,持续约10小时至约160小时。

[0034] 可以经由本领域中已知的合适反应进行从宿主细胞或包含培养的宿主细胞的培养基中回收目标产物(即分离或回收)。例如,可以根据处理进行合适的反应,使用蛋白质沉淀剂(即盐析法)、离心、提取、超声处理、超滤、透析、各种层析技术,包括分子筛层析(即凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、亲和层析及其组合,但不限于此。在这点上,可以从宿主细胞或包含培养的宿主细胞的培养基中收集、回收或分离生成的目标产物。

[0035] 在下文中,会通过参考下述实施例来更为详细描述本发明构思。然而,这些实施例仅用于例示性目的,而不意图限制本发明构思的范围。

[0036] 实施例1:包含新启动子的重组载体和使用其转化的菌株的制备

[0037] (1) 包含Po₂的重组载体和使用其转化的菌株的制备

[0038] 就合成诱导靶基因表达的启动子而言,分析源自属于棒杆菌属的微生物和属于埃希氏菌属的微生物的各种启动子的序列,从而合成具有SEQ ID NO:1的核苷酸序列的启动子。该合成的启动子称为o₂启动子(在下文中命名为“Po₂”)。为了测量用于诱导靶基因表达的Po₂活性,将Po₂与GFP基因的可读框(ORF)可操作连接,从而制备重组载体。然后,用重组载体转化每种棒杆菌和大肠杆菌菌株,从而制备每种棒杆菌和大肠杆菌的经转化的菌株。

[0039] 另外,为了制备具有增强的生成L-氨基酸(例如L-精氨酸)或支链氨基酸(诸如L-缬氨酸)(作为目标产物的例子)的能力的菌株,使用Po₂增强精氨酸或缬氨酸的生物合成基因的表达。

[0040] (1.1) 载体pECCG117-Po₂-gfp和使用其转化的菌株的制备

[0041] (1.1.1) 载体的制备

[0042] 通过使用合成的Po₂作为模板和包含KpnI/EcoRV限制性位点的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:2的引物组进行PCR。根据于94℃的温度变性5分钟,于94℃的温度变性30秒,于60℃的温度退火30秒,以及于72℃的温度聚合30秒的循环进行PCR,其中将循环进行30次。此后,于72℃的温度对菌株再进行聚合7分钟,从而因此获得具有约100bp的长度的Po₂。

[0043] 通过使用pGFPuv载体(由Clontech, USA制备)作为模板和包含PstI/EcoRV限制性位点的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4的引物组进行PCR。根据于94℃的温度变性5分钟,于94℃的温度变性30秒,于55℃的温度退火30秒,以及于72℃的温度聚合1分钟的循环进行PCR,其中将循环进行30次。此后,于72℃的温度再进行聚合7分钟,从而因此获得包含GFP基因的ORF的SEQ ID NO:6。

[0044] 在可以在大肠杆菌和棒杆菌中表达的穿梭载体pECCG117(参见Biotechnology letters vol 13, No.10, p.721-726 (1991))的PstI和KpnI位点处,用限制酶PstI和EcoRV处理Po2,并且用限制酶KpnI和EcoRV处理GFP基因的ORF。然后,通过使用DNA连接酶(conjugating enzyme)将经处理的Po2和GFP基因的ORF彼此可操作连接,从而制备重组载体,其中Po2和GFP基因彼此连接。在这里,重组载体命名为pECCG117-Po2-gfp。

[0045] (1.1.2) 使用载体制备经转化的菌株

[0046] 通过电脉冲法用载体pECCG117和重组载体pECCG117-Po2-gfp中每种转化谷氨酸棒杆菌ATCC13032,然后从含有25mg/L卡那霉素的选择性培养基中获得经转化的菌株。用载体pECCG117和重组载体pECCG117-Po2-gfp转化的获得的菌株各自命名为ATCC13032/pECCG117和ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp。

[0047] 另外,通过热休克法用重组载体pECCG117-Po2-gfp转化大肠杆菌DH5α,然后从含有25mg/L卡那霉素的Luria-Bertani (LB) 琼脂培养基获得经转化的菌株。获得的菌株命名为DH5α/pECCG117-Po2-gfp,并且分配为保藏名称“CA01-2290”。根据国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约的条款,在保藏号KCCM11591P下在2014年10月23日在韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM) 保藏CA01-2290。

[0048] (1.2) 载体pECCG117-Po2-argJ和使用其转化的菌株的制备

[0049] (1.2.1) 载体的制备

[0050] 就合成载体而言,其中用于增强的精氨酸生成的主要生物合成基因,例如编码双功能性鸟氨酸乙酰基转移酶/N-乙酰谷氨酸合酶的argJ基因(Ncg11341, SEQ ID NO:7)由Po2表达,使用重组载体pECCG117-Po2-gfp制备载体pECCG117-Po2-argJ。

[0051] 详细地,通过使用谷氨酸棒杆菌ATCC13869的染色体作为模板和SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的引物组对菌株进行PCR,从而确保包含argJ基因的DNA片段。通过使用Pfu聚合酶根据于94℃的温度变性1分钟,于58℃的温度退火30秒,和于72℃的温度聚合2分钟的循环进行PCR,其中将循环进行30次。因此,扩增具有约1,201bp的长度并且包含5'端的EcoRV和3' PstI限制酶位点的片段。纯化通过PCR生成的扩增片段,与经EcoRV和PstI限制酶处理的载体pECCG117-Po2-gfp混合,然后使用In-fusion克隆试剂盒连接在一起,从而制备重组载体,其命名为pECCG117-Po2-argJ。

[0052] (1.2.2) 使用载体制备经转化的菌株

[0053] 通过电脉冲方法(参见KR 10-0791659)用重组载体pECCG117-Po2-argJ转化谷氨酸棒杆菌KCCM10741P(其是精氨酸生产菌株),然后从含有25mg/L卡那霉素的选择性培养基获得经转化的菌株。获得的菌株命名为KCCM10741P/pECCG117-Po2-argJ。

[0054] (1.3) 载体pECCG117-Po2-ilvE和使用其转化的菌株的制备

[0055] (1.3.1) 载体的制备

[0056] 就合成载体而言,其中用于增强的缬氨酸生成的主要生物合成基因,例如编码支

链氨基酸氨基转移酶的ilvE基因(Ncg12123,SEQ ID NO:10)由Po2表达,使用重组载体pECCG117-Po2-gfp制备载体pECCG117-Po2-ilvE。

[0057] 详细地,通过使用谷氨酸棒杆菌ATCC14067的染色体作为模板和SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的引物组对菌株进行PCR,从而确保包含ilvE基因的DNA片段。通过使用Pfu聚合酶根据于94℃的温度变性1分钟,于58℃的温度退火30秒,和于72℃的温度聚合2分钟的循环进行PCR,其中将循环进行30次。因此,扩增具有约1,201bp的长度并且包含5'端的EcoRV和3'PstI限制酶位点的片段。纯化通过PCR生成的扩增片段,与经EcoRV和PstI限制酶处理的载体pECCG117-Po2-gfp混合,然后使用In-fusion克隆试剂盒连接在一起,从而制备重组载体,其命名为pECCG117-Po2-ilvE。

[0058] (1.3.2) 使用载体制备经转化的菌株

[0059] 通过电脉冲方法(参见KR 10-1117022)用重组载体pECCG117-Po2-ilvE转化谷氨酸棒杆菌KCCM111201P(其是缬氨酸生产菌株),然后从含有25mg/L卡那霉素的选择性培养基获得经转化的菌株。获得的菌株命名为KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE。

[0060] 比较例1:包含对照启动子的重组载体和使用该载体转化的菌株的制备

[0061] 为了测量Po2表达诱导活性,使用GFP基因来可操作连接已知的强启动子(例如Ptrc、Pcj1、Pcj4或Pcj7(参见KR 10-0620092))或野生型启动子(例如aceEP(WT))与GFP基因的ORF以制备重组载体。然后,用重组载体转化每种棒杆菌和大肠杆菌菌株,从而制备每种棒杆菌和大肠杆菌的经转化的菌株。

[0062] 另外,为了评估使用Po2实现增强的靶基因生成的包含主要生物合成基因的经转化的菌株,分别制备包含用于增强的精氨酸生成的主要生物合成基因的经转化的菌株或包含用于增强的缬氨酸生成的主要生物合成基因的经转化的菌株。

[0063] (1) 制备具有与Po2相比就活性而言与Po2不同的启动子的gfp表达载体和谷氨酸棒杆菌的经转化的菌株

[0064] 基于美国国立卫生研究所(NIH Genbank)确保aceEP(WT)的碱基序列,并且通过使用野生型谷氨酸棒杆菌ATCC13032的染色体作为模板和包含Kpn I/EcoRV限制性位点的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的引物组对其进行PCR。以与实施例1的(1.1)中相同的方式进行PCR,从而制备命名为pECCG117-aceEP(WT)-gfp的重组载体。

[0065] 以与实施例1的(1.1)中相同的方式,用制备好的载体pECCG117-aceEP(WT)-gfp和载体pECCG117-Pcj1-gfp、pECCG117-Pcj4-gfp、和pECCG117-Pcj7-gfp(参见KR 10-0620092)中每种转化谷氨酸棒杆菌菌株,从而制备经转化的菌株,其各自命名为ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp、ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp、ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp,和ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp。

[0066] (2) 制备具有与Po2相比就活性而言与Po2不同的启动子的gfp表达载体和大肠杆菌的经转化的菌株

[0067] 基于美国国立卫生研究所(NIH Genbank)确保Ptrc的碱基序列,并且通过使用pTrc99A(NCBI GenBank,M22744)作为模板和包含KpnI/EcoRV限制性位点的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的引物组对其进行PCR。以与实施例1的(1.1)中相同的方式进行PCR,从而制备命名为pECCG117-Ptrc-gfp的重组载体。

[0068] 以与实施例1的(1.1)中相同的方式,用制备好的载体pECCG117-Ptrc-gfp和载体

pECCG117-Pcj1-gfp和pECCG117-Pcj4-gfp中每种转化大肠杆菌菌株,从而制备经转化的菌株,其各自命名为DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp、DH5 α /pECCG117-Pcj1-gfp,和DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp。

[0069] (3) 具有与Po2相比就目标产物生产力而言与Po2不同的启动子的经转化的菌株的制备

[0070] (3.1) 谷氨酸棒杆菌的经转化的菌株,具有精氨酸生产力的经转化的菌株的制备

[0071] 以与实施例1的(1.2.1)中相同的方式使用载体pECCG117-Pcj7-gfp制备命名为pECCG117-Pcj7-argJ的载体,只是通过使用SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:17的引物组进行PCR。

[0072] 然后,以与实施例1的(1.2.2)中相同的方式通过使用载体pECCG117-Pcj7-argJ制备经转化的菌株,并且命名为KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ。

[0073] (3.2) 谷氨酸棒杆菌的经转化的菌株的制备,该经转化的菌株具有缬氨酸生产力

[0074] 以与实施例1的(1.3.1)中相同的方式使用载体pECCG117-Pcj7-gfp载体制备命名为pECCG117-Pcj7-ilvE的载体,只是通过使用SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:18的引物组进行PCR。

[0075] 然后,以与实施例1的(1.3.2)中相同的方式通过使用载体pECCG117-Pcj7-ilvE制备经转化的菌株,并且命名为KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE。

[0076] 实施例2:确认用于诱导靶基因表达的Po2活性

[0077] (1) 确认用于在谷氨酸棒杆菌中诱导靶基因表达的Po2活性

[0078] 为了测量用于在谷氨酸棒杆菌的经转化的菌株中诱导靶基因表达的Po2活性,比较实施例1的(1.1.2)的命名为ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp的经转化菌株的绿色荧光蛋白(GFP)活性的测量与实施例1的(1.1.2)的ATCC13032/pECCG117和比较例1的(1)的各自命名为ATCC13032/pECCG117-aceEP(WT)-gfp、ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp、ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp,和ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp的经转化菌株的GFP活性的测量。

[0079] 通过1:20的体积比将上述每种谷氨酸棒杆菌的经转化的菌株在含有25ml种子培养基的250-ml弯角瓶(corner bottle)中接种,然后于30°C的温度摇动培养(以约200rpm的速度),直到在培养中期阶段(OD₆₀₀=10.0)中培养菌株。在完成培养后,通过离心(以约5,000rpm的速度,约15分钟)收集细胞。用0.1%Tris.HCl(pH 8.0)缓冲液溶液将收集的细胞清洗两次,然后在相同的缓冲液溶液中重悬,于610nm的浊度约160。在以1.25g/1.5ml悬浮液添加玻璃珠后,通过使用珠磨器(bead beater)将细胞破坏6分钟。通过离心(以约15,000rpm的速度,约20分钟)收集含有细胞提取物的上清液,然后根据Bradford法(参见Bradford,M.M 1976.Anal.Biochem.72:248-254)就其中的蛋白质浓度而言定量测量。然后,使用Laure Gory法等用488nm激发波长的光照射相同量的细胞提取物,并且通过使用LS-50B分光光度计(Perkin-Elmer)测量511nm的发射波长的光,从而测定GFP基因的表达。表1中显示了测量每种菌株中的GFP活性的结果。

[0080] [种子培养基]

[0081] 20g葡萄糖、5g硫酸铵、5g酵母提取物、1.5g尿素、4g KH₂PO₄、8g K₂HPO₄、0.5g MgSO₄·7H₂O、150 μ g生物素、1.5mg盐酸硫胺素、3mg泛酸钙(calcium panthothenic acid)、3mg烟酰胺(基于1L蒸馏水),和pH 7.2。

[0082] [表1]

[0083] 谷氨酸棒杆菌的荧光强度

[0084]

菌株	荧光强度
ATCC13032/pECCG117	0.0
ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp	2339.5
ATCC13032/pECCG117-aceEP (WT) -gfp	170.7
ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp	589.6
ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp	920.5
ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp	270.4

[0085] 如表1的结果中显示的,确认了Po2在谷氨酸棒杆菌中具有启动子活性,并且命名为ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp的菌株展现出野生型ATCC13032/pECCG117-aceEP (WT) -gfp菌株的荧光强度的至少13倍的荧光强度。另外,确认了命名为ATCC13032/pECCG117-Po2-gfp的菌株以比使用已知的强启动子(例如Pcj1、Pcj4和Pcj7)的各自命名为ATCC13032/pECCG117-Pcj1-gfp、ATCC13032/pECCG117-Pcj4-gfp,和ATCC13032/pECCG117-Pcj7-gfp的菌株的水平高得多的水平展现荧光强度。因此,确认了Po2充当表达靶基因的强启动子。

[0086] (2) 确认用于在大肠杆菌中诱导靶基因表达的Po2活性

[0087] 为了测量用于在大肠杆菌的经转化的菌株中诱导靶基因表达的Po2活性,比较命名为实施例1的(1.1.2)的DH5 α /pECCG117-Po2-gfp的经转化菌株的GFP活性的测量与各自命名为实施例1的(1.1.2)的ATCC13032/pECCG117和比较例2的(2)的DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp、DH5 α /pECCG117-Pcj1-gfp和DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp的经转化菌株的GFP活性的测量。

[0088] 通过1:20的体积比将上述每种大肠杆菌的经转化的菌株在含有25ml含卡那霉素的LB培养基的250-ml弯角瓶中接种,然后摇动培养(以约200rpm的速度),直到在培养中期阶段(OD₆₀₀=3.0)中培养菌株。在完成培养后,通过离心(以约5,000rpm的速度,约15分钟)收集细胞,用0.1%Tris.HCl (pH 8.0)缓冲液溶液清洗两次,在相同的缓冲液溶液中重悬,通过超声处理破坏,然后进行离心(以约15,000rpm的速度,约20分钟)以获得含有细胞提取物的上清液。根据Bradford法就其中的蛋白质浓度而言定量测量上清液。然后,使用Laure Gory法等用488nm激发波长的光照射相同量的细胞提取物,并且通过使用LS-50B分光光度计(Perkin-Elmer)测量511nm的发射波长的光,从而测定GFP基因的表达。表2中显示了测量每种菌株中的GFP活性的结果。

[0089] [表2]

[0090]

菌株	荧光强度
DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp	287.0
DH5 α /pECCG117-Po2-gfp	248.9
DH5 α /pECCG117-Pcj1-gfp	3041.9
DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp	135.1

[0091] 如表2的结果中显示的,确认了Po2在大肠杆菌中具有启动子活性,并且命名为DH5 α /pECCG117-Po2-gfp的菌株展现出与命名为DH5 α /pECCG117-Ptrc-gfp(已知其为强启动子)的菌株的水平相似的水平并且比DH5 α /pECCG117-Pcj4-gfp菌株的水平高的荧光强度。因此,确认Po2在大肠杆菌中充当表达靶基因的强启动子。

[0092] 实施例3:用于增强的目标产物生产力的菌株的评估

[0093] (1) 用于增强的精氨酸生产的菌株的评估

[0094] 就评估影响精氨酸生成的因素而言,在通过使用Po2表达用于精氨酸的主要生物合成基因(即argJ基因)时,就精氨酸生产力而言比较实施例1的(1.2.2)的命名为KCCM10741P/pECCG117-Po2-argJ的菌株(其用作用于增强的argJ基因生成的菌株)与命名为KCCM10741P的非转化菌株(没有经转化的精氨酸生产力)和比较例1的(3.1)的命名为KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ的菌株。

[0095] 将1环每种上述经转化的菌株在含有25ml生产培养基的250-ml弯角瓶中接种,然后以约200rpm的速度于30°C的温度摇动培养48小时。在完成培养后,通过HPLC测量L-精氨酸的生成。表3中显示了测量L-精氨酸生成的结果。

[0096] [生产培养基]

[0097] 葡萄糖6%,硫酸铵3%,磷酸一钾(monopotassium phosphate)0.1%,七水合硫酸镁0.2%,玉米浸出液(CSL)1.5%,NaCl 1%,酵母提取物0.5%,生物素100 μ g/L和pH7.2

[0098] [表3]

[0099] KCCM10741P中的精氨酸生成

[0100]

菌株	OD	精氨酸浓度(g/L)
KCCM110741P	89	3.1
KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ	85	4.6
KCCM10741P/pECCG117-Po2-argJ	82	5.7

[0101] 如表3的结果中显示的,确认了Po2导致argJ基因表达增强的谷氨酸棒杆菌中改善的精氨酸生成。特别地,与对照菌株中的精氨酸生成相比,谷氨酸棒杆菌中的精氨酸生成增加约84%,并且与命名为KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-argJ的菌株中的精氨酸生成相比增加约23%。因此,确认Po2影响增强的argJ基因表达。

[0102] (2) 用于增强的L-缬氨酸生产的菌株的评估

[0103] 就评估影响缬氨酸生成的因素而言,在通过使用Po2表达用于缬氨酸的主要生物合成基因(即ilvE基因)时,就L-缬氨酸生产力而言比较实施例1的(1.3.2)的命名为KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE的菌株(其用作用于增强的ilvE基因生成的菌株)与命名为KCCM11201P的非转化菌株(没有经转化的L-缬氨酸生产力)和比较例1的(3.2)的命名为KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvEof(3.2)的菌株。

[0104] 将1环每种上述经转化的菌株在含有25ml生产培养基的250-ml弯角瓶中接种,然后以约200rpm的速度于30°C的温度摇动培养72小时。在完成培养后,通过HPLC测量L-缬氨酸的生成。表4中显示了测量L-缬氨酸生成的结果。

[0105] [生产培养基]

[0106] 葡萄糖5%,硫酸铵2%,磷酸一钾0.1%,七水合硫酸镁0.05%,CSL 2.0%,生物素

200 μ g/L和pH7.2

[0107] [表4]

[0108] KCCM11201P中的缬氨酸生成

[0109]

菌株	缬氨酸的浓度 (g/L)
KCCM11201P	2.8
KCCM11201P/pECCG117-Pcj7-ilvE	3.3
KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE	3.7

[0110] 如表4的结果中显示的,确认了Po2导致ilvE基因表达增强的谷氨酸棒杆菌中改善的缬氨酸生成。特别地,与对照菌株中的缬氨酸生成相比,命名为KCCM11201P/pECCG117-Po2-ilvE的菌株中的缬氨酸生成显著增加约32%,并且与命名为KCCM10741P/pECCG117-Pcj7-ilvE的菌株中的缬氨酸生成相比增加约17%。因此,确认Po2影响增强的ilvE基因表达。

[0111] [保藏号]

[0112] 保藏机构:韩国微生物保藏中心(国际)

[0113] 保藏号:KCCM11591P

[0114] 保藏日期:2014年10月23日

[0115] 根据上述一个或多个例示性的实施方案,新的启动子可以根据用于诱导靶基因表达的微生物而具有各种活性。在这点上,新的启动子可以在生成目标产物期间需要控制靶基因活性的情况下使用,导致目标产物的有效生成。

[0116] 应当理解,本文中描述的例示性的实施方案应当仅以描述意义而不是为了限制目的考虑。通常应当认为每个例示性的实施方案内的特征或方面的描述可用于其它例示性的实施方案中的其它类似的特征或方面。

[0117] 虽然已经参考附图描述了一个或多个例示性的实施方案,但是本领域普通技术人员应当理解可以在不背离如由所附权利要求书限定的发明构思的精神和范围的前提下对其进行形式和细节的各种变化。

[0118]

国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约
国际表格

至: CJ第一制糖株式会社
CJ CHEILJEDANG CENTER
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400
大韩民国

在本页底部列出由国际
保藏机构按照7.1条发出
的原保藏的受理证据

I. 微生物的表示	
保藏人给出的用于识别的表示: 大肠杆菌CA01-2290	由国际保藏机构给出的保藏号: KCCCM11591P
II. 科学描述和/或提出的分类学名称	
上文I下鉴定的微生物伴有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 提出的分类学名称 (在适用的地方用交叉标记)	
III. 收据和承诺 本国际保藏机构接受上述I下鉴定的微生物, 该微生物在2014年10月23日由它接受。(原始保藏日期) ¹	
IV. 国际保藏机构	
名称: 韩国微生物保藏中心 地址: 韩国首尔市西大门区 (Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil, Seodaemun-gu, SEOUL 120-861, Republic of Korea)	具有代表国际保藏机构或授权局的权力的人的签名: 日期: 2014年10月23日

1 在适用6.4(d)的情况下, 此类日期是获得国际保藏机构状态的日期; 在获得国际保藏机构的状态后在布达佩斯条约外进行的保藏被转化为布达佩斯条约下的保藏的情况下, 此类日期是由国际保藏机构接受的微生物的日期。

BP/4表格

单页

序列表

	<110> CJ 第一制糖株式会社	
	<120> 新的启动子及其用途	
	<130> PX051110	
	<150> KR 2015-0014587	
	<151> 2015-01-29	
	<160> 18	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 86	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 02 启动子的 DNA 序列	
	<400> 1	
	caataatcgt gaattttggc agcaacagaa ttatgtggta taatggaac gtgcaaagc	60
	atagattatt ggaggagatc aaaaca	86
	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0001]	<223> 用于 02 启动子的 PCR 的正向引物	
	<400> 2	
	ggtacccaat aatcgtgaat ttiggc	26
	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 02 启动子的 PCR 的反向引物	
	<400> 3	
	gatatcgtt ttgatctct ccaata	26
	<210> 4	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 pGFPuv 的 PCR 的正向引物	
	<400> 4	
	gatatcaiga gtaaaggaga aga	23
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 pGFPuv 的 PCR 的反向引物	

<400> 5		
ctgcagttat ttgtagagct cat		23
<210> 6		
<211> 729		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> GFP 的 DNA 序列		
<400> 6		
gatatcatga gtaaaggaga agaacttttc actggagttg tcccaattct tgttgaatta		60
gatgggtgatg ffaatgggca caaattttct gtcagtggag agggggaagg tgatgcaaca		120
tacggaaaac tiacccttaa atttatttgc actactggaa aactacctgt lccatggcca		180
acacttglea ciactttctc tlatggigt caatgcitll cccgllatcc ggalcatatg		240
aaacggcatg acittttcaa gagtgccatg cccgaagggt atgtacagga acgcactata		300
tctttcaaag atgacgggaa ctacaagacg cgtgctgaag tcaagittga aggtgatacc		360
cttgttaatc gtatcgagtt aaaaggtatt gattttaaag aagatggaaa cattctcgga		420
cacaactcag agtacaacta taactcacac aatgtataca tcacggcaga caaacaaaag		480
aatggaatca aagctaactt caaaattcgc cacaacattg aagatggatc cgttcaacta		540
gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt ggcgatggcc ctgtctcttt accagacaac		600
cattacctgt cgacacaatc tgcccttctg aaagatccca acgaaaagcg tgaccacatg		660
[0002] gtccttcttg agtttgaac tgctgctggg attacacatg gcatggatga gctctacaaa		720
taactgcag		729
<210> 7		
<211> 1167		
<212> DNA		
<213> 谷氨酸棒杆菌		
<400> 7		
atggcagaaa aaggcattac cgcgcgaaa ggcttcgttg ctcttgcaac gaccgcgggt		60
attaaagctt ctggcaatcc tgacatggcg ttgggtggtta accagggtcc agagtittcc		120
gcagcggccg tgittacacg taaccgagtt ttgcagcgc ctgtgaaggf gagccgagag		180
aacgttgcct atggccagat cagggtgtt ttgtacaacg ctggtaatgc taatgcgtgt		240
aatggctctg aggggtgagaa ggatgctcgt gagtctgttt ctcatctagc tcaaaatttg		300
ggcttggagg atccgatal ttgigtgtgt tccaactggc ttattggiga gtigtctccg		360
atggataagc tcaatgcagg tattgatcag ctgaccctg agggccttt gggtagaat		420
ggtagcagct ctgccaagcc gatcatgacc actgacacgg tggataagga aaccgtcgtg		480
tttgcgatg gttggactgt cggcggaatg ggcaaggcgg tggcatgat ggcgcctct		540
cttccacca tgcgtgctg cttagaccct gatgatccg ttactcagga aatggctcag		600
atcgcgctgg ctaatgctac ggcggttac tttagacccc tggatatga tggatcaacc		660
tccaccaatg acaccgtgtt cctgctggca tctggcgeta gcggaatcac cccaactcag		720
gatgaactca acgatgcggt gtaecgagct tgttctgata tgcagcgaa gcttcaggct		780

gatgcagagg gtgigaccaa gcgcgttgcg gtgacagtgg tgggaaccac caacaacgag	840
caggecgatta atgcggctcg cactgttgcg cgtgacaatt tgitcaagtg cgcaatgitt	900
ggatctgac caaactgggg tegegtgttg gctgcagtcg gcaiggetga tgcigatatg	960
gaaccagaga agatttctgt gttcttcaat ggtaagcag tatgccttga ttccactggc	1020
gctcctggig ctctgtaggt ggatctttcc ggcgctgaca ttgatgtccg aatigatttg	1080
ggcaccagtg gggaggcca ggcaacagtt cgaaccactg acctgagctt ctctactgtg	1140
gagatcaact ccgctacag ctcttaa	1167
<210> 8	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于 argJ 的 PCR 的正向引物	
<400> 8	
gagatcaaaa cagatatcat ggcaaaaaa ggcaaac	38
<210> 9	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于 argJ 的 PCR 的反向引物	
[0003] <400> 9	
atccccggg ctgcagttaa gagctgtacg cggagt	36
<210> 10	
<211> 1104	
<212> DNA	
<213> 谷氨酸棒杆菌	
<400> 10	
atgacgtcat tagagtac agtaaccgt accgaaaac cgacgtacc cgatcgtctg	60
aaggaaattc ttgccgacc gaagttcgt aagiactca ccgaccacat ggtgaccatt	120
gaciggaacg agtcggaagg ctggcacaac gcccaatlag tgccatacgc gccgattcct	180
atggatcctg ccaccaccgt attccactac ggacaggcaa tttitgaggg aatiaaggcc	240
taccgccatt cggacgaaac cataagact ttccgtcctg atgaaaacgc cgagcgtatg	300
cagcgttcag cagctcgaat ggcaatgcca cagllgcaa ccgaggact taliaagca	360
cttgaactgc tggtagacgc gatacaggat tgggttctg agtacggcgg ggaagcttcc	420
ctctacctgc gccattcat gatctccacc gaaatggct tgggtgtcag cccagctgat	480
gcttacaagt tcttggtcat cgcattccca gtcggcgtt acttaccgg tggatcaag	540
ccgtttccg ctggtctgag cgaagattac gtcggcgtg caccggcgg aactggtagc	600
gccaaatttg ctggcaacta cgcggcttct ttgcttgcce agtcccagge tgggaaaag	660
ggctgtgacc aggtcgtatg gttggatgce atcgagcaca agtaccatga agaaatgggt	720
ggcatgaacc ttgggttcat ctaccgcaac ggcgaccaag tcaagctagt caccctgaa	780

	ctttccgget cactacticc aggcatacct cgcaagtcac ttctacaagt agcacgcgac	840
	ttgggctacg aagtagaaga gcgaaagatc accaccaccg agtgggaaga agacgcaaag	900
	tctggcgcca tgaccgagge atttgcttgc ggtactgcag ctgttaicac cccigtgtgc	960
	accgtgaaat cagctcacgg caccctcgaa gigaacaaca atgaagtcgg agaaatcacg	1020
	atgaagcttc gtgaaacct caccggaatt cagcaaggaa acgttgaaga ccaaaacgga	1080
	tggtttacc cactggttgg ctaa	1104
	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 ilvE 的 PCR 的正向引物	
	<400> 11	
	gagatcaaaa cagatatcat gacgtcatta gagttc	36
	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 ilvE 的 PCR 的反向引物	
	<400> 12	
[0004]	atcccccggg ctgcagttag ccaaccagtg ggta	34
	<210> 13	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 accP(WT) 的 PCR 的正向引物	
	<400> 13	
	ggtaccgtea ttacccccgc ctaacc	26
	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 aceP(WT) 的 PCR 的反向引物	
	<400> 14	
	gatatcaaaa gtcacttcci taagtg	26
	<210> 15	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 trcP 的 PCR 的正向引物	
	<400> 15	
	ggtacctgc acgggcacc aatget	26

	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 trcP 的 PCR 的反向引物	
	<400> 16	
	gatatcctgt ttcctgtgtg aaattg	26
	<210> 17	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 用于 argJ 的 PCR 的正向引物	
	<400> 17	
	cgaaaggaaa cactcgatat catggccaaa aaaggcatta c	41
	<210> 18	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于 ilvE 的 PCR 的正向引物	
	<400> 18	
	cgaaaggaaa cactcgatat catgacgta ttagagttc	39

[0001]

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号	国际申请号 PCT/KR2016/000444
------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A. 对说明书第 <u>7</u> 页, 第 <u>22</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国首尔市西大门区(Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil, Seodaemun-gu, SEOUL 120-861, Republic of Korca)	
保藏日期 2014-10-23	保藏号 KCCM11591P
C. 补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时) 下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员