



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월14일
(11) 등록번호 10-2454110
(24) 등록일자 2022년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
C12Q 1/02 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0084688
(22) 출원일자 2020년07월09일
심사청구일자 2020년07월09일
(65) 공개번호 10-2022-0006810
(43) 공개일자 2022년01월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160096889 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
김경민
대구광역시 북구 대현남로서4길 36 강남스타빌라 202호
이제철
대구광역시 달서구 조암남로32길 13 쌍용예가아파트 102동 1806호
신민상
대구광역시 중구 국제보상로 655, 1705호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 8 항

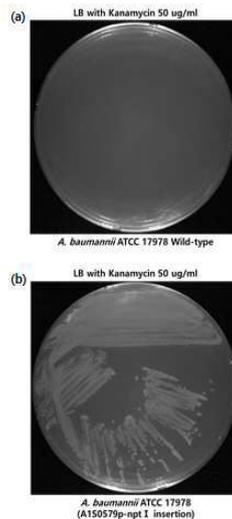
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현의 저해물질 탐색용 제조합 플라스미드 및 돌연변이 균주

(57) 요약

본 발명은 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 제조합 플라스미드, 상기 제조합 플라스미드를 이용한 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 돌연변이 균주의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 돌연변이 균주 및 상기 돌연변이 균주를 이용한 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질의 탐색 방법에 관한 것으로, 상기 제조합 플라스미드 및 돌연변이 균주는 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터 부위와 프로모터가 없는 항생제 저항성 유전자를 포함함으로써 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터에 의해 항생제 저항성 유전자 발현이 조절되고, 상기 돌연변이 균주를 이용한 저해물질 탐색 과정에서 항생제가 첨가된 배지에서 균의 성장을 측정함으로써 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현의 저해물질을 손쉽게 탐색할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12Q 1/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345249363
과제번호	2016R1D1A1B01008960
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원
연구과제명	CRISPR 조절 억제기전을 통한 항생제내성균주 제어기작 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경북대학교
연구기간	2016.06.01 ~ 2022.05.31
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터; 및 항생제 저항성 유전자가 순차적으로 작동 가능하게 연결된 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드로서,

상기 프로모터는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터 부위인 것이고,

상기 ppGpp 생합성 관련 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 A1S_0579인 것이고,

상기 재조합 플라스미드는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 것인, 재조합 플라스미드.

청구항 2

표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역; 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터; 항생제 저항성 유전자; 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역이 순차적으로 작동 가능하게 연결된 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드로서,

상기 프로모터는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터 부위인 것이고,

상기 ppGpp 생합성 관련 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 A1S_0579인 것이고,

상기 재조합 플라스미드는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 갖는 것인, 재조합 플라스미드.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서,

상기 항생제 저항성 유전자는 nptI 유전자인 것인, 재조합 플라스미드.

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 2에 있어서,

상기 표적 유전자는 glmS 유전자인 것인, 재조합 플라스미드.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 1 또는 2의 재조합 플라스미드를 미생물에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계를 포함하는 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 돌연변이 균주의 제조방법.

청구항 9

청구항 8의 방법으로 제조된 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 돌연변이 균주.

청구항 10

- a) 항생제가 포함된 고체배지에서 청구항 9의 돌연변이 균주를 배양하는 단계; 및
 - b) 상기 돌연변이 균주에 시험물질을 접촉시키는 단계
- 를 포함하는 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질의 탐색 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,
상기 a) 단계의 항생제는 카나마이신인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물의 신호전달 경로에 관여하는 ppGpp의 생합성 관련 유전자 발현의 저해물질을 탐색하기 위한 재조합 플라스미드 및 돌연변이 균주에 관한 것으로, 보다 구체적으로 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드, 상기 재조합 플라스미드를 이용한 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 돌연변이 균주의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 돌연변이 균주 및 상기 돌연변이 균주를 이용한 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질의 탐색 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)는 감마프로테오박테리아(Gammaproteobacteria)에 속하는 그람음성균으로서 토양, 물 등의 자연 환경에 널리 분포하며, 면역력이 강한 건강한 사람에게는 약한 병원성을 보이나, 면역 시스템이 손상 또는 약화된 사람들에게서 높은 독성을 보이는 기회감염균이다. 특히, 카바페넴계(carbapenems), 아미노글리코사이드계(aminoglycosides), 플로로퀴놀론계(fluoroquinolones) 등의 항생제에 내성을 갖는 다제내성(multiple drug resistance, MDR) 특성으로 인해 중환자실 환자 감염과 같은 원내 감염(hospital-acquired infection)의 주요 병원균으로 주목 받고 있으며, 아시네토박터 바우마니 감염 시 폐렴, 심내막염, 혈류감염, 요로감염, 복막염 등을 포함한 다양한 감염증을 일으킨다. 아시네토박터 바우마니 감염증을 치료하기 위해서 콜리스틴(colistin), 티지사이클린(tigecycline), 이미페넴(imipenem), 메로페넴(meropenem)과 같은 항생제들이 주로 처방되지만, 이들에 대해서도 장기간 사용 시 저항성이 나타나므로 아시네토박터 바우마니에 대한 새로운 저해 물질의 개발이 여전히 요구되고 있다.

[0004] 한편, ppGpp는 박테리아의 성장 조절 및 항생제에 대한 내성(tolerance), 독성 유전자의 발현 등 다양한 스트레스 반응에 관여하는 신호전달 분자로 역할을 하는 2차 전달물질(secondary messenger)이다. ppGpp 활성화는 항균 치료의 임상 성공 및 효과에 큰 영향을 미치는데, 박테리아 내에서 ppGpp가 부재할 경우에는 체내에서 합성되는 아미노산이 부족하여 생존이 어려울 뿐만 아니라 세포의 비정상적인 분열 또는 부동화(immobility)가 야기될 수 있다. 최근 본 발명자들의 연구에서는 ppGpp가 다제내성균인 *A. baumannii*에서 EP(efflux pump) 관련 유전자의 발현을 조절하여 항생제 민감성에 영향을 미친다는 것을 확인하였으며, 효과적인 항생제가 없는 *A. baumannii*에 대해 ppGpp 생합성과 관련된 A1S_0579 유전자가 새로운 항생 물질의 대상이 될 수 있음을 제시하였

다 (J Antimicrob Chemother. 2020. HW Jung, et al.).

[0005] 이에, 본 발명자들은 *A. baumannii*의 항생 물질로서 ppGpp 생합성과 관련된 A1S_0579 유전자의 발현을 저해하는 물질을 탐색하는데 유용한 리포터 균주를 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) HW Jung, et al. Role of ppGpp-regulated efflux genes in *Acinetobacter baumannii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Volume 75, Issue 5, May 2020, Pages 1130-1134,

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 ppGpp 생합성과 관련된 A1S_0579 유전자의 프로모터 부위 및 항생제 저항성 유전자를 포함하는 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드를 이용한 ppGpp 생합성 관련 유전자 저해물질 탐색용 돌연변이 균주의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 ppGpp 생합성 관련 유전자 저해물질 탐색용 돌연변이 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이 균주를 이용한 ppGpp 생합성 관련 유전자 저해물질의 탐색 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 A1S_0579 유전자는 본 발명자들의 이전 연구 (J Antimicrob Chemother. 2020. HW Jung, et al.)를 통해 ppGpp 생합성과 관련된 것으로 확인되었다. ppGpp는 박테리아에서 이차대사산물의 합성 및 형태분화의 제어에 관여하는 물질로서 박테리아의 생존에 영향을 미치는 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다. 따라서, ppGpp 생합성과 관련된 A1S_0579 유전자 발현의 저해물질은 해당 박테리아의 감염을 예방하거나 치료하기 위한 물질로서 매우 유용한 가치가 있다고 판단된다.

[0014] 본 발명의 일 양상은 ppGpp 생합성과 관련된 A1S_0579 유전자를 타겟(target)으로 하는 저해물질을 확인, 탐색하기 위해 A1S_0579 유전자의 프로모터 부위 및 항생제 저항성 유전자를 포함하는 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드를 제공한다.

[0015] 상기 A1S_0579 유전자의 프로모터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터; 및 항생제 저항성 유전자가 순차적으로 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에서 사용된 “프로모터(promoter)”는 이에 작동 가능하게 연결된 유전자의 전사를 허용하고 조절하는 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 프로모터는 RNA 중합효소를 결합시키기 위한 인식 서열 및 전사 개시 부위(전사 개시 부위)를 함유한다. 특정 세포 유형 또는 숙주 세포 내에서 타겟 유전자를 발현시키기 위해서는 적합한 기능성 프로모터를 선택해야 한다. 이들은 예를 들면, GenBank와 같은 데이터뱅크에 기탁되어 있으며, 시판되거나 개개의 공급원으로부터 폴리뉴클레오티드 서열 내에 클로닝된 별개의 요소 또는 요소들로서 입수할 수 있다.

[0018] 상기 프로모터는 미생물에서 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터 부위인 것으로, 상기 미생물은 병원균(pathogenic bacteria)으로서 악티노미세스(*Actinomyces*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 보렐리아(*Borrelia*) 속, 클라미디아(*Chlamydia*) 속, 클로스트리듐(*Clostridium*) 속, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속, 에세르시아(*Escherichia*) 속, 헬리코박터(*Helicobacter*) 속, 클렙시엘라(*Klebsiella*) 속, 리지오넬라(*Legionella*) 속, 미

코박테리움(*Mycobacterium*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 시젤라(*Shigella*) 속, 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속, 비브리오(*Vibrio*) 속 또는 아시네토박터(*Acinetobacter*) 속 미생물일 수 있으며, 바람직하게는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 일 수 있다.

- [0019] 본 발명에서 사용된 "서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터"는 타겟 유전자인 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 A1S_0579 유전자의 유전정보를 지니고 있는 DNA 염기서열 앞부분에 위치하여 유전자의 전사를 조절하는 부위이며, A1S_0579 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자는 A1S_0579 유전자 프로모터 부위에 의해 발현이 조절된다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 "항생제 저항성 유전자"는 당업계의 공지된 항생제 저항성 유전자가 그 발현을 조절하는 프로모터 없이 재조합 플라스미드에 도입되는 것을 의미한다. 구체적으로, 재조합 플라스미드에 도입되는 항생제 저항성 유전자는 ORF(open reading frame) 영역일 수 있다. 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터와 연결된 항생제 저항성 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터에 의해 발현이 조절되어 항생제 저항성 유전자의 발현 정도를 쉽게 측정할 수 있기 때문에 본 발명의 재조합 플라스미드에서 리포터 유전자(reporter gene)의 역할을 한다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 "항생제 저항성 유전자"는 항생제에 대하여 저항성을 가지는 유전자로, 이러한 유전자가 있는 세균 또는 미생물은 해당 항생제를 처리한 환경에서도 생존하므로, 본 발명에서 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터에 의해 발현이 조절되는 항생제 저항성 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 얻는 과정에 선별 마커 (또는 리포터 마커)로 사용된다.
- [0022] 상기 항생제 저항성 유전자는 암피실린(ampicilin), 테트라사이클린(tetracyclin), 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloroamphenicol), 스트렙토마이신(streptomycin), 네오마이신(neomycin) 등의 항생제에 대한 저항성 유전자 등을 사용할 수 있으며, 일례로 nptI 유전자, bla 유전자 (ampicillin resistance gene), 또는 cat 유전자 (chloramphenicol resistance gene) 등일 수 있다. 구체적으로, 상기 항생제 저항성 유전자는 nptI 유전자 (서열번호 2)일 수 있다.
- [0023] 상기 nptI 유전자는 네오마이신 인산전달효소(Neomycin phosphotransferase) 단백질을 암호화하는 유전자로서 미생물에 카나마이신(kanamycin), 트리메소프림(trimethoprim), 네오마이신(neomycin), 겐타마이신(geneticin), 파로모마이신(paromomycin) 등의 항생제에 대한 저항성을 부여할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"이란 일반적으로 기능을 수행하도록 유전자의 발현 조절 서열과 타겟 단백질을 코딩하는 염기서열이 작동 가능하게 연결되어 코딩하는 염기서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 플라스미드와의 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있다.
- [0025] 이러한 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드는 미생물 안에서 스스로 복제 가능하도록 복제시작점(ori) 및 이를 조절하는 요소(element)를 포함하므로 본 발명자가 도입하고자 하는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자를 포함하는 DNA 단편이 스스로 발현될 수 있다. 이때, 상기 DNA 단편은 미생물 안에 1개 이상의 카피, 즉 다중 카피(multiple copy)의 형태로 존재할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 따른 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드는 *A. baumannii*의 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터; 및 항생제 저항성 유전자가 순차적으로 연결된 것으로, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 이때, 서열번호 3의 염기서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 상동성을 갖는 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석될 수 있다. 이러한 재조합 플라스미드를 이용하여 형질전환체 또는 돌연변이 균주를 제조할 경우, 염색체 내에 도입된 단일 카피(single copy) 또는 다중 카피의 DNA 단편에 의해 항생제 저항성 유전자가 발현된다.
- [0027] 한편, 본 명세서에서 "DNA 단편", "유전자 단편" 및 "유전자"는 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있고, "재조합 플라스미드" 및 "재조합 벡터"도 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 일 구체예에 따르면, 상기 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드는 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역; 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터; 항생제 저항성 유전자; 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역이 순차적으로 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다.

다.

- [0030] 본 발명에서 사용된 "표적 유전자"는 상기 재조합 플라스미드를 도입하려는 미생물의 게놈(genome) 내 위치를 의미하며, 구체적으로 상기 표적 유전자의 5'- 및 3'- 말단에 본 발명의 재조합 플라스미드가 도입되어 상기 재조합 플라스미드를 포함하는 돌연변이 균주가 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 표적 유전자는 glmS 유전자일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 사용된 "표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역" 및 "표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역"은 상기 표적 유전자의 각 말단과 상동성을 갖는 핵산 서열을 의미하며, 구체적으로 상동성에 의한 상동재조합을 통해 미생물의 게놈 내 정해진 위치에 본 발명의 재조합 플라스미드를 도입하는 목적의 서열일 수 있다. 상기 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역은 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역은 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 상동성은 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상일 수 있으며, 상기 핵산 영역은 500 내지 1,500 bp, 700 내지 1,300 bp, 또는 900 내지 1,100 bp일 수 있다.
- [0032] 상기 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자는 전술한 바와 동일하다.
- [0033] 상기 재조합 플라스미드는 미생물을 선별하기 유전자를 추가로 포함할 수 있으며, 그 유전자로는 cat 유전자일 수 있다. 상기 cat 유전자는 미생물에 항생제인 클로람페니콜(chloramphenicol)에 대한 저항성을 부여하므로, 본 발명에서는 상기 재조합 플라스미드에 포함됨으로써 형질전환된, 돌연변이 균주의 선별 마커로서 사용될 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 재조합 플라스미드는 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역 뒤에 sacB 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 상기 sacB 유전자는 수크로스를 분해하는 효소로 알려진 수크라제(sucrase)를 암호화하는 유전자 (DNA 단편)를 의미한다.
- [0035] 구체적으로, 상기 자살 벡터를 포함하는 미생물을 수크로스가 포함된 배지에서 배양하는 경우, 상기 sacB 유전자에 의해 발현된 수크라제는 수크로스를 분해하여 미생물에게 독성을 나타내는 산물을 생성하게 되며, 이는 숙주 미생물의 게놈 DNA에서 단일교차 재조합이 유발되지 않은, 즉 항생제 저항성을 나타내는 미생물이 배제된다. 반면, 숙주 미생물의 게놈 DNA에서 단일교차 재조합이 유발되면, 벡터의 DNA 단편 전체를 포함하는 영역이 미생물의 게놈 DNA에서 제거되어 야생형 다제내성 미생물로 복귀하거나, 또는 벡터의 DNA 단편 중에서도 목적하는 ompA 프로모터와 Rluc8 유전자만을 제외한 영역이 제거될 수 있다.
- [0036] 이러한 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드는 자살 벡터(suicide vector 또는 suicide plasmid vector)로서 미생물 안에서 스스로 복제되지 않고, 이에 포함된 유전자, 즉 본 발명자가 도입하고자 하는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자를 포함하는 DNA 단편이 스스로 발현되지 않으나, 상기 DNA 단편이 상동재조합을 통해 미생물의 염색체 내에 삽입되는 경우 목적하는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자만이 삽입되는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 구체예에 따른 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드는 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역; *A. baumannii*의 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터; 항생제 저항성 유전자; 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역이 순차적으로 작동 가능하게 연결된 것으로, 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 이때, 서열번호 6의 염기서열과 높은 상동성을 갖는 서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 상동성을 갖는 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석될 수 있다. 이러한 재조합 플라스미드를 이용하여 형질전환체 또는 돌연변이 균주를 제조할 경우, 상기 다중 카피의 벡터를 포함하고 있더라도 염색체 내에 도입된 단일 카피의 DNA 단편에 의해 서만 항생제 저항성 유전자가 발현된다.
- [0039] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 재조합 플라스미드를 미생물에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계를 포함하는 ppGpp 생합성 저해 물질 탐색용 돌연변이 균주의 제조방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자가 순차적으로 작동 가능하게 연결된 본 발명의 재조합 플라스미드를 미생물에 도입하면, 상기 재조합 플라스미드에 포함된 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자가 포함된 DNA 단편이 미생물의 게놈 DNA에 삽입되어 형질전환체로 제조될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역, 서열번호 1로 표시되는 염기

서열로 이루어진 프로모터, 항생제 저항성 유전자 및 표적 유전자의 3' 말단과 상동인 핵산 영역이 순차적으로 작동 가능하게 연결된 본 발명의 재조합 플라스미드 (자살 벡터)를 미생물에 도입하면, 상기 재조합 플라스미드에 포함된 표적 유전자의 5' 말단과 상동인 핵산 영역에 해당하는 gImS 상위 유전자가 1차 단일교차 재조합이 유발되어 상기 재조합 플라스미드에 포함된 DNA 단편 전체가 미생물의 게놈 DNA에 삽입된 형질전환체를 제조할 수 있다. 상기 형질전환체를 일정 시간 배양 시 일정 확률에 따라 2차 단일 교차 재조합이 일어날 수 있다. 상기 형질전환체를 과량의 수크로스가 포함된 배지에 접종하고 배양하면, 2차 단일교차 재조합이 유발되지 아니한 미생물은 재조합 플라스미드에 포함된 sacB 유전자로부터 발현된 수크라제에 의해 수크로스를 분해하고, 이로부터 생성되는 독성산물로 인하여 배제될 수 있다. 상기 2차 단일교차 재조합이 유발되면, 상기 자살 벡터의 DNA 단편 전체를 포함하는 영역이 미생물의 게놈 DNA에서 제거되어 야생형 미생물로 복귀하거나, 또는 재조합 플라스미드의 DNA 단편 중에서도 nptI 유전자만을 포함하는 영역이 제거될 수 있다.

[0042] 상기 형질전환체의 제조 성공 여부는 nptI 유전자에 의한 항생제 (예를 들면, 카나마이신 및/또는 트리메소프림) 저항성에 의해 확인할 수 있다.

[0043] 상기 재조합 플라스미드를 미생물에 도입하여 형질전환체를 획득하는 방법은 당업계의 공지된 핵산을 세포 내로 도입하는 방법을 이용할 수 있으며, 숙주 미생물 또는 숙주 세포에 따라 당업계의 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO4) 침전, 염화칼슘(CaCl2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란(dextran)법, 양이온 리포솜법(cationic liposome), 초산 리튬(Lithium superoxide)-DMSO법 등일 수 있다.

[0044] 본 발명에서 사용된 "형질전환(transformation)"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용된 "형질전환체(transformant)"는 플라스미드 또는 벡터가 숙주 세포 내로 형질전환된 후, 벡터 내의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터 및 항생제 저항성 유전자를 포함하는 핵산 분자 서열이 숙주 세포 게놈 상의 내생적(endogeneous) 유전자 부위의 서열과 상동 재조합을 일으키며 염색체 내로 삽입되거나, 플라스미드 형태로 보유할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 상기 방법으로 제조된 ppGpp 생합성 관련 유전자 저해물질 탐색용 돌연변이 균주를 제공한다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 돌연변이 균주는 리포터 균주(reporter strain)로서 카나마이신 항생제 저항성 유전자 (nptI)가 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터에 의해 조절되기 때문에 카나마이신 존재 환경에서 성장이 가능한 반면, 재조합 플라스미드를 갖고 있지 않은 균주는 성장하지 못하였다. 이는 재조합 플라스미드 내에 존재하는 항생제 저항성 유전자 nptI가 *A. baumannii*의 ppGpp 생합성 관련 A1S_0579 유전자의 발현 조절 시스템에 의해 조절됨을 의미한다. 따라서 본 발명에서 구축된 리포터 균주는 A1S_0579 유전자의 발현 저해물질을 고속대량으로 탐색하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 a) 항생제가 포함된 고체배지에서 상기 돌연변이 균주를 배양하는 단계; 및 b) 상기 돌연변이 균주에 시험물질을 접촉시키는 단계를 포함하는 ppGpp 생합성 관련 유전자 저해물질의 탐색 방법을 제공한다.

[0050] 상기 a) 단계의 항생제는 재조합 플라스미드에 도입된 항생제 저항성 유전자가 저항성을 나타내는 항생제로서 카나마이신(kanamycin), 트리메소프림(trimethoprim), 네오마이신(neomycin), 젠타마이신(geneticin; G418), 파로모마이신(paromomycin) 등일 수 있으며, 바람직하게는 카나마이신일 수 있다.

[0051] 이러한 ppGpp 생합성 유전자 관련 저해물질의 탐색 방법은 시험물질이 ppGpp 생합성 관련 유전자의 발현을 저해하는 저해물질일 경우, ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 항생제 저항성 유전자가 발현되지 못하기 때문에 해당 항생제가 포함된 고체배지에서 돌연변이 균주가 성장할 수 없다. 그러므로, 시험물질에 의해 상기 돌연변이 균주가 성장하지 못하는 경우에는 접촉된 후보물질을 ppGpp 생합성 관련 유전자의 발현 저해물질로 판단할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 탐색 방법은 간편하게 해당 균주의 성장을 측정하여 ppGpp 생합성 관련 유전자의 발현 저해물질을 탐색할 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명에 따른 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현 저해물질 탐색용 재조합 플라스미드 및 돌연변이 균주는 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터 부위와 항생제 저항성 유전자를 포함함으로써 ppGpp 생합성 관련 유전자의 프로모터에 의해 항생제 저항성 유전자 발현이 조절되고, 상기 돌연변이 균주를 이용한 저해물질 탐색 과정에서 항

생체가 첨가된 배지에서 균의 성장을 측정함으로써 ppGpp 생합성 관련 유전자 발현의 저해물질을 손쉽게 탐색할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 플라스미드 pWH1266_A1S0579p-npt I의 개발 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 플라스미드 pWH1266_A1S0579p-npt I의 A1S_0579 프로모터 부위 및 npt I의 DNA 시퀀싱을 통해 도입 유전자들을 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 플라스미드 pDM4_A1S0579p-npt I의 개발 모식도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 플라스미드 pDM4_A1S0579p-npt I의 A1S_0579 프로모터 부위 및 npt I의 DNA 시퀀싱을 통해 도입 유전자들을 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) 야생형 균주 및 재조합 플라스미드 (B) pWH1266_A1S0579p-npt I로 형질 전환된 돌연변이 균주에 대한 카나마이신 항생제 첨가된 배지에서의 성장 여부를 확인한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) 야생형 균주 및 재조합 플라스미드 (B) pDM4_A1S0579p-npt I로 유전자 삽입된 돌연변이 균주에 대한 카나마이신 항생제 첨가된 배지에서의 성장 여부를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0058] **실시예 1. A1S_0579-npt I의 제조**

[0059] **1-1. pWH1266_A1S0579p-npt I 재조합 플라스미드 제조**

[0060] pWH1266 플라스미드에 클로닝 하기 위하여, A1S_0579 프로모터 부위와 npt I (kanamycin 항생제 저항성 유전자)를 Overlap extension PCR을 통하여 연결시켜 주었다. 이때, PCR에는 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다. 상기 재조합 유전자의 각 양 끝에는 Pst I이 인지하는 염기서열 CTGCAG을 추가하여 상기 재조합 유전자에 Pst I를 처리한 후 동일한 제한효소로 처리된 pWH1266 플라스미드에 라이게이션(ligation)하여 클로닝하였다. 상기 재조합 플라스미드 맵을 도 1에 나타내었다. 새롭게 구축된 플라스미드는 DNA 시퀀싱을 통하여 확인하였다. 시퀀싱 결과는 도 2에 나타내었다.

표 1

[0061]

프라이머 (서열번호)	프라이머 서열 (5' →3')	용도
GlmS_Up_F_spe I (서열번호 7)	GGACTAGTTGGTTTGAGCAATTGACTTGG	GlmS 상위 부위 증폭
GlmS_Up_R (서열번호 8)	CTTCACTTGCTGCCTTAATAATGATCTTTTTTGAATTACTCTACA	
A1S_0579p_F (서열번호 9)	GTAATTCAAAAAGATCATTATTAAGGCAGCAAGTGAAGAAATGGTGCAG	A1S_0579 프로모터 부위 증폭
A1S_0579p_R (서열번호 10)	TGGCTCATACCATTCTCCTGGATATGTAAGTC	
Npt I_F (서열번호 11)	CAGGAGAATGGTATGAGCCATATTCAACGGGAAA	npt I 증폭
Npt I_R (서열번호 12)	GCAGGTGATGCTGCCTCGTGAAGAAGG	
GlmS_Down_F (서열번호 13)	AGGCAGACATCACCTGCTTTAATAATTGATTGATTAAGC	GlmS 하위 부위 증폭
GlmS_Down_R_Apa I (서열번호 14)	GTTGGGCCAGTCGGTTTTAGCAGACCG	

A1S_0579p_F_pst I (서열번호 15)	AACTGCAGGCAAGTGAAGAAATGGTGCAG	A1S_0579 프로모터-npt I 증폭
Npt I_R_pst I (서열번호 16)	AACTGCAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGG	

[0063]

1-2. pDM4_A1S0579p-npt I 재조합 플라스미드 제조

[0064]

pDM4 플라스미드에 클로닝 하기 위하여, G1mS 상위(up) 부위, A1S_0579 프로모터 부위, npt I, G1mS 하위(down) 부위를 순서대로 Overlap extension PCR을 통하여 연결시켜 주었다. 상기 재조합 유전자의 각 양 끝에는 Spe I 과 Apa I 을 인지하는 염기서열 ACTAGT 및 GGGCCC을 추가하여 상기 재조합 유전자에 Spe I 과 Apa I 을 처리한 후 동일한 제한효소로 처리된 pDM4 플라스미드에 라이게이션하여 클로닝하였다. 상기 재조합 플라스미드 맵을 도 3에 나타내었다. 새롭게 구축된 플라스미드는 DNA 시퀀싱을 통하여 확인하였다. 시퀀싱 결과는 도 4에 나타내었다.

[0066]

실시예 2. ppGpp 합성 저해물질 탐색용 리포터 균주의 제조

[0067]

2-1. Multi-copy 리포터 균주 제작 (pWH1266_A1S0579p-npt I 도입)

[0068]

상기 실시예 1-1에서 제조된 재조합 플라스미드 pWH1266_A1S0579p-npt I 는 전기천공법(electroporation)을 통해 *A. baumannii* ATCC 17978 Wild-type 세포내로 형질전환 시켰다. 형질전환된 *A. baumannii*는 카나마이신 (50 µg/ml) 항생제가 첨가된 LB(Luria Bertani) 고체배지에서 선별하였다. 상기 선별 과정을 통해 구축된 리포터 균주(reporter strain)가 갖고 있는 카나마이신 항생제 저항성 유전자(nptI)가 A1S_0579 프로모터에 의해 조절이 되는지 확인하였다.

[0069]

그 결과, 도 5를 참조하면, 재조합 플라스미드 pWH1266_A1S0579p-npt I 가 도입되지 않은 *A. baumannii*는 카나마이신이 첨가된 배지에서 성장하지 못하였으나, pWH1266_A1S0579p-npt I 가 도입된 *A. baumannii*는 카나마이신이 첨가된 배지에서 성장한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 pWH1266_A1S0579p-npt I 내에 존재하는 카나마이신 저항성 유전자 (nptI)가 *A. baumannii*의 A1S_0579 유전자 발현 조절 시스템에 의하여 조절된다는 것을 시사한다.

[0071]

2-2. Single-copy 리포터 균주 제작 (pDM4_A1S0579p-npt I 도입)

[0072]

상기 실시예 1-2에서 제조된 재조합 플라스미드 pDM4_A1S0579p-npt I 자살 벡터는 R6K 자살 벡터의 복제를 가능하게 하는 λ pir 가 존재는 공여 균주(Donor strain)인 *E. coli* SM10 λ pir (thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km λ pir)에 형질전환 시켰다. 형질전환된 *E. coli* SM10 λ pir는 항생제 클로람페니콜 (20 µg/ml)이 첨가된 LB(Luria Bertani) 고체배지에서 선별하였다. 선별된 *E. coli* SM10 λ pir pDM4_A1S0579p-npt I 를 공여체 균주로, *A. baumannii* ATCC 17978 Wild-type을 수용체 균주로 하여 pDM4_A1S0579p-npt I 을 긴주게이전(conjugation)을 통해 상기 재조합 플라스미드를 형질전환 시켰다. 형질전환된 *A. baumannii*는 카나마이신 (50 µg/ml) 및 트리메토프림 (10 µg/ml) 항생제가 첨가된 LB(Luria Bertani) 고체배지에서 선별하였다. 선별된 균주는 카나마이신 (50 µg/ml) 항생제 및 10% 수크로스(Sucrose)가 첨가된 LB(Luria Bertani) 고체배지에서 선별하였다. 상기 선별 과정을 통해 구축된 돌연변이 리포터 균주(reporter strain)가 갖고 있는 카나마이신 항생제 저항성 유전자(nptI)가 A1S_0579 프로모터에 의해 조절이 되는지 확인하였다.

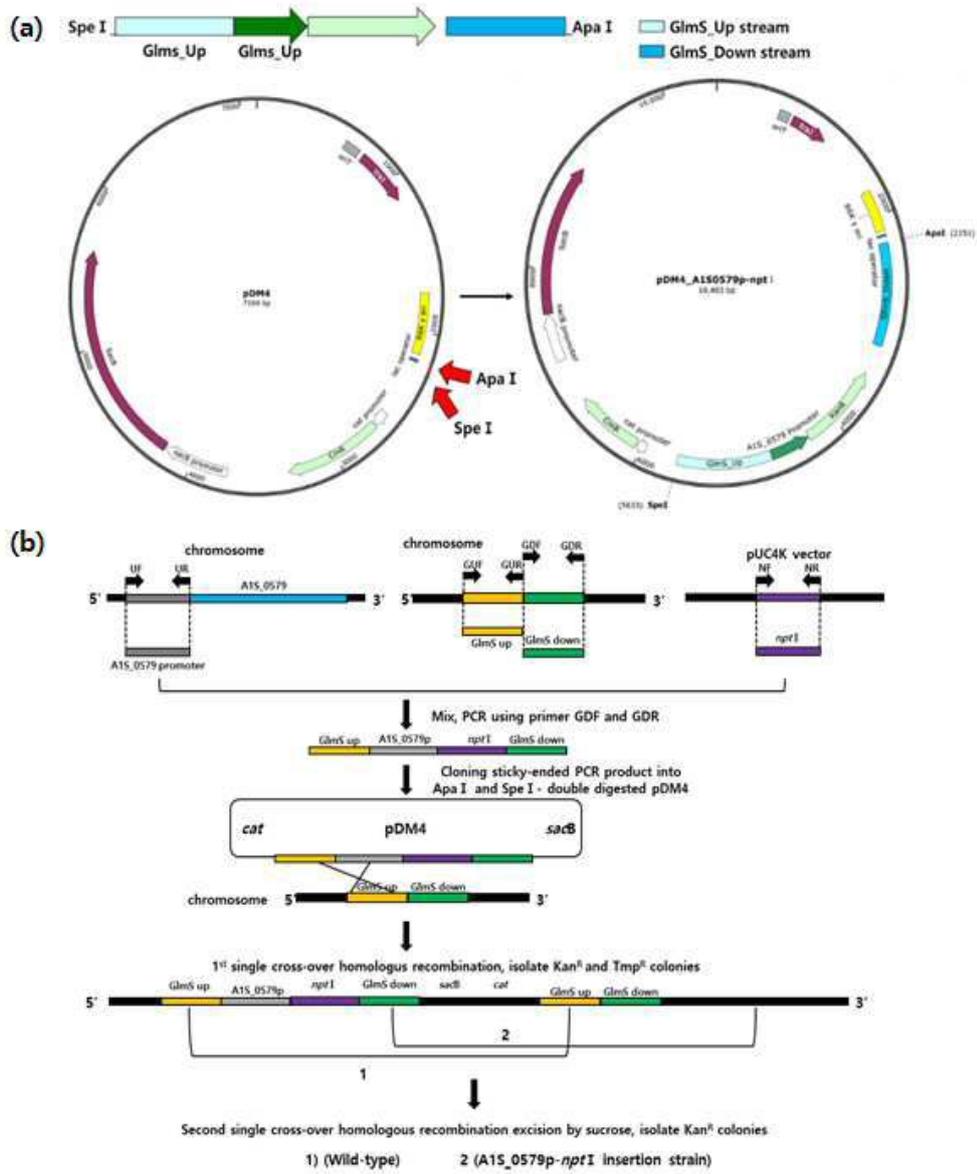
[0073]

그 결과, 도 6을 참조하면, 재조합 플라스미드 pDM4_A1S0579p-npt I 가 도입되지 않은 *A. baumannii*는 카나마이신이 첨가된 배지에서 성장하지 못하였으나, pDM4_A1S0579p-npt I 가 도입된 *A. baumannii*는 카나마이신이 첨가된 배지에서 성장한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 pDM4_A1S0579p-npt I 내에 존재하는 카나마이신 저항성 유전자 (nptI)가 *A. baumannii*의 A1S_0579 유전자 발현 조절 시스템에 의하여 조절된다는 것을 시사한다.

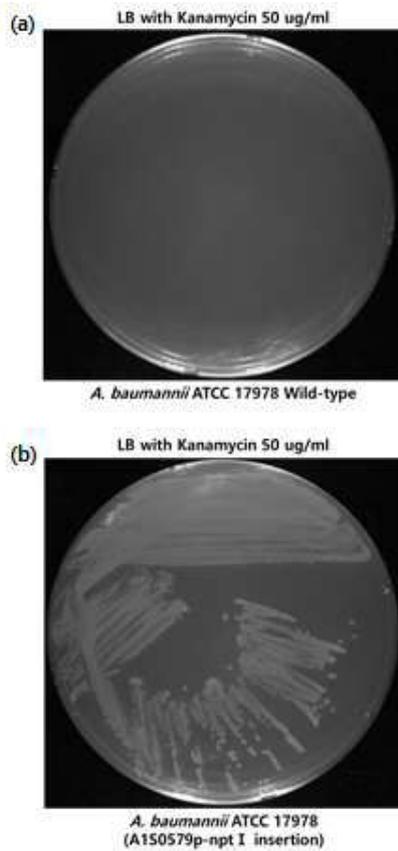
[0075]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면3



도면6



서열 목록

- <110> Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Recombinant plasmids and mutant strains for screening inhibitors of ppGpp biosynthesis-related gene expression
- <130> PN200045
- <160> 16
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 399
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> A1S_0579 Promoter
- <400> 1

gcaagtgaag aaatggtgca gcgggcaaca gataatgcaa agcgtaataa tctggtgcaa 60

gcaagcttct tttcacaaga tttacaaaa gatttttcgc atcattcttg ggcaaatcaa 120

ggatttgatg cattattgat tgatcctcct cgtgctggg catatgaaat tatgcagtat 180
 gtgccgaact ttggagcaaa aagaatcgtt tatgtatcat gtaatccagc aacattagca 240
 agggatgcag gtgttttggg tcaacatggt taccagttaa aaaaagcagc ggttatggac 300
 atgtttacgc acacagaaca tgttgaatcg attgctttat ttgagaaaat tcaagagata 360
 aacgattaaa aacatgagtt acatatccag gagaatggt 399

<210> 2

<211> 1095

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> npt I

<400> 2

atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc tcgagccgc gattaaatc caacatgat 60

gctgatttat atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc 120

tatcgattgt atgggaagcc cgatcgcgca gattgtttc tgaaacatgg caaaggtagc 180

gttgcaatg atgttacaga tgagatggc agactaaact ggctgacgga atttatgcct 240

cttcgacca tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg 300

atccccggga aaacagcatt ccaggtatta gaagaatc ctgattcagg tgaaaatatt 360

gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccg ttgcattcga ttcctgtttg taattgtcct 420

tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgt caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg 480

gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa 540

gaaatgcata agcttttggc attctcaccg gattcagtcg tcaactcatgg tgatttctca 600

cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc 660

ggaatcgcag accgatacca ggatcttggc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct 720

ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa tatggtattg ataactctga tatgaataaa 780

ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt ttctaactcag aattggttaa ttggttgtaa 840

cactggcaga gcattacgct gacttgacgg gacggcggct ttgttgaata aatcgaactt 900

ttgctgagtt gaaggatcag atcacgcac ttcccgacaa cgcagaccgt tccgtggcaa 960

agcaaaaagt caaaatcacc aactggtcca cctacaacaa agctctcacc aaccgtggct 1020

ccctcacttt ctggctggat gatggggcga ttcaggcctg gtatgagtca gcaacacctt 1080

cttcacgagg cagac 1095

<210> 3

<211> 10411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pWH1266_A1S0579p-npt I

<400> 3

ttctcatggt tgacagctta tcatcgataa gctttaatgc ggtagtttat cacagttaa	60
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat gcgctcatcg tcatectcgg	120
caccgtcacc ctggatgctg taggcatagg cttggttatg ccgglactgc cgggcctctt	180
gcgggatata gtccattccg acagcatcgc cagtcactat ggcgtgctgc tagcgtata	240
tgcgttgatg caatttctat gcgcacccgt tctcggagca ctgtccgacc gctttggccg	300
ccgccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgca tcatggcgac	360
cacaccgctc ctgtggatcc tctacgccg acgcatcgtg gccggcatca cgggcgccac	420
aggtgcggtt gctggcgctt atatcgccga catcacgat ggggaagatc gggctcgcca	480
cttcgggctc atgagcgtt gtttcggcgt gggtatggtg gcaggccccg tggccggggg	540
actgttgggc gccatctctt tgcatgcacc attccttgcg gcggcgggtgc tcaacggcct	600
caactacta ctgggctgct tctaatgca ggagtcgcat aaggagagc gtcgaccgat	660
gcccttgaga gccttaacc cagtcagctc cttccggtgg gcgcggggca tgactatcgt	720
cgccgcaact atgactgct tctttateat gcaactcgta ggacaggtgc cggcagcgt	780
ctgggtcatt ttcggcgagg accgctttcg ctggagcgcg acgatgatcg gcctgtcgt	840
tgcggtatc ggaatcttc acgcectcgc tcaagccttc gtcactggtc ccgccacaa	900
acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc cggcatggcg gccgacgcg tgggctacgt	960
cttgctggcg ttcgcgacg gaggtggat ggccttcccc attatgattc ttctccttc	1020
cggcggcate gggatgcccc cgttgcaggc catgctgtcc aggcaggtag atgacgacca	1080
tcagggacag cttaagat cgctcgcggc tcttaccagc ctaacttca tcattggacc	1140
gctgatcgtc acggcgattt atgccgctc ggcgagcaca tggaacgggt tggcatggat	1200
tgtaggcgcc gcctatacc ttgtctgct ccccgcgttg cgtcgcggtg catggagccg	1260
ggccacctcg acctgaatgg aagccggcgg cacctccta acgattcac cactccaaga	1320
attggagcca atcaattctt gcgggaaact gtgaatgcgc aaaccaaccc ttggcagaac	1380
atatccatcg cgtccgcat ctccagcagc cgcacgcggc gcatctcggg cagcgttggg	1440
tcctggccac ggggtgcgat gatcgtgctc ctgtcgttga ggaccggct aggctggcgg	1500
ggttgctta ctggttagca gaatgaatca ccgatacgcg agcgaacgtg aagcgaactgc	1560
tgctgcaaaa cgtctcgcac ctgagcaaca acatgaatgg tcttcggttt ccgtgttctg	1620

taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgc cc tgcaccatta tgttccggat ctgcatcgca 1680
 ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct acatctgtat taacgaagcg ctggcattga 1740

 ccctgagtga tttttctctg gtcccgcgc atccataaccg ccagtgtgtt accctcacia 1800
 cgttccagta accgggcatg ttcacatca gtaaccgta tcgtgagcat cctctctctg 1860
 ttcacggta tcattacccc catgaacaga aatccccctt acacggagcg atcagtgacc 1920
 aaacaggaaa aaaccgcct taacatggcc cgtttatca gaagccagac attaacgctt 1980
 ctggagaaac tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag acatctgtga atcgcttcac 2040
 gaccacgctg atgagcttta ccgacgctgc tgcgttgc gctgttcaag tgtcaattgc 2100
 tctactctgt tgcctctc aatgatagac atatcaagcc tttcagctt tttattgcgc 2160

 tttttgattt catcattacg cttgacgac tccagttcct cccccctgcg cttggcgtgg 2220
 gtggcttcaa gtccctcctt gaatgtcggc tcgatgtcta gtcacgac cttatgactg 2280
 cggatgacaa ctctcacctc aagccctgct cgctctaggt ggacgttctg cagatccgcc 2340
 actttttccc tgatttttt cagcgttgag tctgatcta gtcacctgac tttcttcct 2400
 agcccttgcg gtgaaggct tcttgtgtc attagtatgt gggcgtgatg gtttcttca 2460
 tcacttccc catgcacatg aggggcatgg atcgctacgt ccaccgccac tccataggct 2520
 ttaactaagg actggcacia ctcgtaaca agtgcctgac gctgtgtctt atccagtca 2580

 tgcggcaatg ctatctctac ttcctttgct aatcttgct cctgtttgat gtcaccgttc 2640
 ttttttagtt cggattgctc taccgattc catagggtt gacgatctaa catgtcagga 2700
 ctgccccag ttggggcaaa aatttgggtg tattcaatgc ctgtttttt ggtgtagtec 2760
 tgctctttc cgtacgtac acagtacaat ttttcgctg ctcggtatgc tgcacatgcc 2820
 acgattgagc gaccatctga cctcgaatg tctgcattt cacaatggta aattgccatt 2880
 ttcacacct gttattaac agcccccaca agttttgggc ggttgggtg tcgggtttc 2940
 cctgaccgta ctgcaaat ttggcgtagc aaaaatttg cgtaagtgc ccttcggga 3000

 actctgcgag gctaaaagca aaagcaagag caataaggct ttgactttgt tttttgattt 3060
 tgctcgtgc gtcggatct tgatgtaagt cgagttttg aagtagaaca cttttcacat 3120
 tgatgatggt tcatacttcg gaaaataggt tgagacacag gcattaaaaa tggtaaaaa 3180
 aacagctatg gaattgggtc aatgctcga tgaagaaaag gaaaaattgg aacgtcagga 3240
 aaaggcaaga aaggatctag ctgacgctgt ggtgaaaggc cgagagcaaa aacaggcaag 3300
 gtcagacgat gcaaacgca agatcctgat cggggcttac ttactgaaga aacatgataa 3360

tgacatcaag aaacttgtgg aacaaaaccc cgatTTTTtatt gggtacatta gagaaaatga 3420

 taagcactta ttttcatagg cattagtagt tataaaaaac cctcataaat cgagggtttc 3480
 ttttttatct gcattacttt ttgaatcaat gtactTTTTt agcttgctat ttttactgc 3540
 atacagccgc ttatactctt tctcaatcaa tgcggTcaaa atggctTTTT ggctctcccc 3600
 tgctgcgccc accatgtccg caagcatatc cgacacaccc ttatctataa acacctcaa 3660
 acgttgacta tcaaggcttt tgcgtTTTTc acgatatgct ttttgcgTt cggcattggT 3720
 ttttggcggc tcttttagca tgcctgtgt tttctgatcg ttcgggtctt tcatgtcttt 3780
 aactcccata tagtatatca tagttacagg ataacattgt ttttagttac aggataactt 3840

 tttataaaat ttattttaa aaatttatgc taccctgcaa ctatttttaa attacaggat 3900
 aactatttaa cgttacctg taactatagt taccctgtaa cgctaaatta attacctgt 3960
 aacatatatt ttgttatct gtaacaacta aatattgaaa taactactacc aaagtTacc 4020
 tgtaacgaaa ataactaggT taaaaaatga tccgatttta acattttgcg ttgttccaaa 4080
 agttatcaac agcctagaac gtcataggaa gcgattacag acactttata gctatcagca 4140
 tgggaacata agggcaggat gaaatatggg tcttaaaacg caaatggTga ggttttagag 4200
 gtatttttg aagatgatta aggcggTttg tttttaaTt ttttggcggc tctcaggctg 4260

 cttacatttt aaccagtTca gtgaaaagtT cttttcagc aaatttctgt ttagcacat 4320
 agctaaaact tgcgtggaac atattaagaa ttgaccgaaa tgacacaatc tcaattatat 4380
 ttttttgaa aagttttctt tatcaaatat tttaaatcat tgatttatat ataagtatac 4440
 attcatttta ataattaatc tttattaac aatgatttat ctatattcaa ttgtttaatt 4500
 attcttacta atattatctc tatatcaata ttttttattt aaaaacatat gtttagtagt 4560
 gcttttgatt aaagtaccag agggagggag cagagctgaa tgggaaatac tcacctaga 4620
 gcgattctta aaaaacccc taaagtattc ccattcgatg taccgtcggt cggctgcttt 4680

 cgcatcaggg atgacatcac tgtatcaagc tgccactgtt atgattacga ttgatagcac 4740
 cgctgaaca cgtcataac cgccaattaa atgactactc attgcgtccg ctactctgtt 4800
 cagttcccct agiaatagcg ttttccgat gtgtgctagc gtcactgtac ctcatcacc 4860
 acacatggac agattgagtt acagacattg gctaaatttt tggggtctat gcttgacaaa 4920
 gcgagttaa accttagaat ttaagacagg tacattaagc cctgtggTg aatcattag 4980
 cggctgTcaa acctaatgc tttcgattgc cgatatgtca gtatcgaaga tctgtacccc 5040
 ataaattacg gtaaagcccc aagcaattgc aagggtctt tatctttttt aacaaaaaaa 5100

atttataaat caggatttta taacactaaa taatccaaag tacatgagta agtcatgacc 5160
 actcctgcga tgtgtgtagc actctgagta tccgtattat atcagtgatg tcatatacaa 5220
 ccacataatg cggatgtatc actaactccc tagtatcttt ctgtctgcct gtgcgcccc 5280
 tcagtcgatt atcaacaact aaatctgtct tttcttcaat taaatcatca atttcaatag 5340
 ctgctatagg gttgcgttct tcaagataat catagatatt tctacgatct tggcgagctg 5400
 tttcagteca ctcaatcttc attcttctgct gccagtttgc ccaatgttgc agcacgtcta 5460
 gcggcaaact ctgcctttac gtcctcatgt ggaatcaact tgcctgcatt ggcttcattt 5520

 aagccgatct gtacctgctg cttgaacat ttgtcatagt ctgcggcttc ctggttcttc 5580
 ttaacaaagt cacgcatgaa gtcacggatt agctgcgccc cggaccgatc aacagtccta 5640
 gcaaggcttg aaaattcttg ctttaggtca tggcttacc gaaaggtaaa agtcgcttct 5700
 gtcattgttt tcaactcaat gtgttacatt tgaatgctat tgtaacacat taaaaagtta 5760
 ggtcattgtc tttttcggc ttaggctggt cttggtcata acgtggttta aatgatggct 5820
 gtcgctcatt ctcaagtaaa atttccggt tattaacagc ctgttgcac tgctcatagt 5880
 aaggcatcaa ctgcggtaaa atatcagcaa gtgcctgtct gtctttatcc aggatacggc 5940

 tcaattgcc gattttttc aagtcacgct cataggctat tctgtcgctg atctgctcgt 6000
 atttttgctt tgaacacctt atgtactctt gcatactggt acttgcccat gcctgcgct 6060
 gaagacgtgt aaacatggaa atgtctgaag caacatggtc gctgatatgg tcatactcag 6120
 catctttgac atagccgtat tttgataaat atctttcata gtcctgccgt tctttttgt 6180
 catcttctg tttttgttta gtttctctt ctatctgctg ttgttttctg tgctgttct 6240
 gttgctctc ttttatctct ctgtgataaa tggaaaggct agattgatca ttatccaac 6300
 gtgtgagcat gtcctcaaag ccgtaataat cagcactaaa ccaacctgtt ttcactttca 6360

 ctggtggcgg cagtggctct cccgatctcc ttagcagtgc ttagctgct cgtccctctt 6420
 tgatcacttt atcaagctgc aagcggtcga tattgtcttg caaagccttg taaaatctat 6480
 gctctgctcg ctctcatcc gtttttactt caatcaaata cacatctata agcgtttggc 6540
 ggtgttggtg gtggtcgtat agtgctgtt gtgcggtggc atagactgcg ggggcttgg 6600
 ctacggcatc ctccagctgc ctgcgcggt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca 6660
 tgcagctccc ggagacggtc acagcttctg tgaagcggga tgccgggagc agacaagccc 6720
 gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtacgta 6780

 gcgatagcgg agtgtatct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt 6840
 gcaccatatg cgggtgtgaa taccgcacag atcgtaagg agaaaatacc gcatcagcgg 6900
 ctcttccgct tctcgtctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 6960

atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 7020
 gaacatgtga gcaaaagcc agcaaaagc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 7080
 gttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 7140
 gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt 7200

 gcgctctcct gttccgacce tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tccttcggg 7260
 aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 7320
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg cttatccgg 7380
 taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 7440
 tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtgggtg 7500
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt 7560
 taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 7620

 tggttttttt gtttgaagc agcagattac gcgcaaaaa aaaggatctc aagaagatcc 7680
 tttgatcttt tctacgggtt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt 7740
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctgatctctt ttaaattaaa aatgaagttt 7800
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 7860
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt 7920
 cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgtg caatgatacc 7980
 gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 8040

 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgcg 8100
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctgc 8160
 aggcaagtga agaatgggtg cagcgggcaa cagataatgc aaagcgtaat aatctgggtc 8220
 aagcaagctt cttttcaaa gatttaaaa aagatttttc gcatcattct tgggcaaatc 8280
 aaggatttga tgattattg attgatctc ctctgtctgg tgcatatgaa attatgcagt 8340
 atgtgccgaa ctttggagca aaaagaatcg tttatgtatc atgtaatcca gcaacattag 8400
 caagggatgc aggtgttttg gttcaacatg gttaccagt aaaaaagca gcggttatgg 8460

 acatgtttac gcacacagaa catgttgaat cgattgcttt atttgagaaa attcaagaga 8520
 taacgatta aaaacatgag ttacatatcc aggagaatgg tatgagccat attcaacggg 8580
 aaacgtcttg ctcgaggccg cgattaaatt ccaacatgga tgctgattta tatgggtata 8640
 aatgggctcg cgataatgtc gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgattg tatgggaagc 8700
 ccgatgcgcc agagttgttt ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag 8760
 atgagatggt cagactaac tggctgacgg aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt 8820

ttatccgtac tcctgatgat gcatggttac tcaccactgc gatccccggg aaaacagcat 8880

tccaggtatt agaagaatat cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtg 8940

tcctgcgcgg gttgcattcg attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat 9000

ttcgtctcgc tcaggcgcaa tcacgaatga ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg 9060

atgacgagcg taatggctgg cctgttgaac aagtctggaa agaaatgcat aagcttttgc 9120

catttcacc ggattcagtc gtaactcatg gtgatttctc acttgataac cttatttttg 9180

acgaggggaa attaataggt tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc 9240

aggatcttgc catcctatgg aactgcctcg gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc 9300

tttttcaaaa atatggtatt gataatcctg atatgaataa attgcagttt catttgatgc 9360

tcgatgagtt tttctaata caaattggta attggttgta acactggcag agcattacgc 9420

tgacttgacg ggacggcgcc tttgttgaat aaatcgaact tttgctgagt tgaaggatca 9480

gatcacgcat ctccccgaca acgcagaccg ttccgtggca aagcaaaagt tcaaaatcac 9540

caactggtec acctacaaca aagctctcat caaccgtggc tccctcactt tctggctgga 9600

tgatggggcg attcaggcct ggtatgagtc agcaaacct tcttcacgag gcagacctgc 9660

aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttccaacg 9720

atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 9780

tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 9840

gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 9900

aaaccaagtea ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaac 9960

acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 10020

ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 10080

tcgtgcacce aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 10140

aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaat gttgaatact 10200

catactcttc ctttttcaat attattgaag cttttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 10260

atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 10320

aaaagtcca cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag 10380

gcgtatcacg aggccctttc gtcttcaaga a 10411

<210> 4

<211> 934

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GlnS upstream

<400> 4

tggtttgagc aattgacttg gtgtgccttg ccaagttgag attgcbgagt aattccgtta 60

 tcgctcacca gtgattgtgg aaaatacaact ttacatctgt attcacaat caggcgaaac 120
 agcggatacc ttagctgcac tacgtgaaac tcaaaaacgt gctaaagcaa ataatatcga 180
 tattcagact ttaacgatct gtaacgtcgc aacttcttca atggtgcbgtg aaactgatca 240
 ccacttattg acgcttgcbg gcccbagagat tggggttgca tcaacaaaag cbttcacgac 300
 tcagcttgct gcattaatgt tgttaatctt gaaaattggt caagtgaaac agcbgtattag 360
 caatgcbgtg attgaagagc ttgctcbgtg attgtgcbat agcccbgaaag tgbttcttga 420
 tacacttaag aatgbtcbg aaattttacg tttatcbgaa ttgttcbgtg aaaaacaaca 480

 cbgtttatctc ttagcbcbgtg gcacacacta tccaatcbgt ttggaagbtg cbttaaagct 540
 taaagaaatt tcatatattc acgbgaaagb ttatgbcbgt gbtgbgttga aacacgbcbcb 600
 attgbcbctt gttgbactg aatgbcbat cbgtbttctt gcbcbbaatg acgaaatgbt 660
 tgbtaagctt aagtcbbaata tggbaagagt tcbgbctcbgt gcbgbgtgaaat tattcbgtttt 720
 cbgtgbtga aatagbtggtg tagttgaaaa agaccbtcaa cbtgbcbtcb atattcbcbg 780
 agtaaacgaa tgbcttgcbac caatcbttta tagcbtcbca gttcbgttat tgbtcttaca 840
 cbgttcbgtg ttacbtggtg cbgacbtgta cbgcbcbcbt aacttgbcbga agtcbgtaac 900

 tgbtagbtaa ttcbaaaag atcbttatta agbc 934

<210> 5

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GlnS downstream

<400> 5

atcbcbctgt ttaataatgb attgbttaag cbcbgbtatgb attaatgbcb tattgbgbctt 60
 ttttattgbcb ttcatatcbg tacacagaaag cbttcbctacg aaagaaaata gagaactcbt 120
 cbttagbtcbcb cbgtgcbaaa cbgbcttttt acttttgbcb tgbtttaag tttgbagat 180
 cbttgbcbca cbgagataaa gaagbtaagc gaacttagbcb cbttttattt ttgtcbcbgcb 240

 gbtgaaatgbt gbtgaaabaag ttaggbgbcaa agtcbctgtgb gagaacagga cbttgcbbaac 300
 tgbtgbtgbtt taaacbtgtg acgbtttgbg gtgaaatcac cbgtgcbagc tgbttgbcbbaa 360
 cbcaattaca actgbcbttac atgtgttcbac cbgacbaaa aattcbttta aattcbctgbt 420

gagcattggc atcatcattt gtaatactgt aagcaccgac cacaaggttt aaaatcaata 480
 taaatttatg aagtttcata ttattctcat gattatttat aaatttaaat aaaataaaaa 540
 tatggttcaa ttaaatatta aaataatfff ttaaataata attaatcctc ccacaaacat 600
 aggaaaataa aataattaaa atfftaaaat agaaataatt tataaattta aaaaaacagg 660

tcgcaaaaaa cccaaatfff aaataataa aatagttaac taaaagagaa aatgagtttt 720
 aataatggca tggccaactc cttaaaaatg gagttctacc accagattac cgcgaaactaa 780
 tttagggtgg tagaacgaaa gagggttagc agactgacct agcgaccagc acgcgcgaac 840
 gcgtccccct tccgccctac catagagaaa aagggggcac aaaggttcca cacgggtaat 900
 actgaggaag tataaccgca cacgctaggg tacggtctgc taaaaccgac t 951

<210> 6

<211> 10483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pDM4_A1S0579p-npt I

<400> 6

gacccctttt gtccggtgtt gggttgaagg tgaagccggt cggggccgca gcgggggccc 60
 gcttttcage cttgcccc tgcctcggcc gccgtggctc cggcgtcttg ggtgccggcg 120
 cgggttccgc agccttgccc tgcggtgcgg gcacatcggc gggcttggcc ttgatgtgcc 180
 gcctggcgtg cgagcggaac gtctcgtagg agaactgac cttccccgtt tcccgcattg 240
 gctcccaaat ggtgacgagc gcatagccgg acgctaacgc cgcctcgaca tccgccctca 300
 ccgccaggaa cgcaaccgca gcctcatcac gccggcgctt cttggcccgcg cgggattcaa 360
 cccactcggc cagctcgtcg gtgtagctct ttggcatcgt ctctcgctg tcccctcagt 420

tcagtaattt cctgcatttg cctgtttcca gtcggtagat attccacaaa acagcagga 480
 agcagcgctt ttccgctgca taacctgct tcggggtcat tatagcgatt ttttcggtat 540
 atccatcctt tttgcacga tatacaggat tttgcaaag ggttcgtgta gactttcctt 600
 ggtgtatcca acggcgtcag ccgggcagga taggtgaagt aggcccacc gcgagcgggt 660
 gttccttctt cactgtccct tattcgcacc tggcgggtgct caacgggaat cctgctctgc 720
 gaggttgccc ggetaccgcc ggcgtaacag atgagggcaa gcggatggct gatgaaacca 780
 agccaaccag gaagggcagc ccacctatca aggtgtactg ccttccagac gaacgaagag 840

cgattgagga aaagggcgcg gcggccggca tgagcctgtc ggccctacctg ctggccgtcg 900
 gccagggcta caaatcacg ggcgtcgtgg actatgagca cgtccgcgag ctggcccgca 960

tcaatggcga cctgggcccg ctgggcccgc tgctgaaact ctggctcacc gacgacccgc 1020
gacagggcgc gttcggatgat gccacgatcc tcgccctgct ggcgaagatc gaagagaagc 1080
aggacgagct tggcaaggtc atgatgggcg tgggccgccc gagggcagag ccatgacttt 1140
tttagccgct aaaacggccg ggggggtgcg gtgattgcca agcacgtccc catgctctcc 1200
atcaagaaga gcgacttcgc ggagctggtg aagtacatca ccgacgagca aggcaagacc 1260

gagcgctgg gtcacgtgcg cgtcacgaac tgcgaggcaa acaccctgcc cgctgtcatg 1320
gccgaggtga tggcgaccca gcacggcaac acccgttccg aggccgacaa gacctatcac 1380
ctgctggtta gcttccgcgc gggagagaag cccgacgagg agacgttgcg cgcgattgag 1440
gaccgcatct gcgctgggct tggcttcgcc gagcatcagc gcgtcagtgc cgtgcatcac 1500
gacaccgaca acctgcacat ccatatcgcc atcaacaaga ttcacccgac ccgaaacacc 1560
atccatgagc cgtatcgggc ctaccgccc ctgctgacc tctgcccgac gctcgaacgg 1620
gactacgggc ttgagcgtga caatcacgaa acgcccagc gcgtttccga gaaccgcccg 1680

aacgacatgg agcggcacgc gggcgtggaa agcctggtcg gctggatccg gccacgatgc 1740
gtccggcgta gaggatctga agatcagcag ttcaacctgt tgatagtacg tactaagctc 1800
tcatgtttca cgtactaagc tctcatgttt aacgtactaa gctctcatgt ttaacgaact 1860
aaacctcat ggctaacgta ctaagctctc atggctaacg tactaagctc tcatgtttca 1920
cgtactaagc tctcatgttt gaacaataaa attaataata atcagcaact taaatagcct 1980
ctaaggtttt aagttttata agaaaaaaaa gaatatataa ggcttttaaa gcttttaagg 2040
tttaacggtt gtggacaaca agccagggat gtaacgcact gagaagccct tagagcctct 2100

caaagcaatt ttgagtaca caggaacact taacggctga catgggaatt ccacatgtgg 2160
aattccacat gtggaattgt gacgggataa caatttggg aatcccggga gagctcaggt 2220
taccgcatg caagatctat ctagaagggc ccagtcgggt ttagcagacc gtaccctagc 2280
gtgtcgggtt atacttctc agtattacc gtgtggaacc tttgtcccc ctttttctct 2340
atggtagggc ggaaggggga cgcgttcgcg cgtgctggtc gctaggtcag tctgctaacc 2400
ctctttcggt ctaccacct aaattagttc gcggtaatct ggtggtagaa ctccatttt 2460
aaggagtgg ccatgccatt attaaaactc attttctctt ttagttaact attttattta 2520

tttaaaattt gggttttttg cgacctgttt tttaaaattt ataaattatt tctattttaa 2580
aattttaatt attttattt cctatgtttg tgggaggatt aattattatt taaaaatta 2640
ttttaatatt taattgaacc atatttttat ttattttaaa ttataaata atcatgagaa 2700
taatatgaaa cttcataaat ttatatgat tttaaactt gtggtcggtg cttacagtat 2760
tacaaatgat gatccaatg ctcagcagga atttaaaaga atttgtttgt caggtgaaca 2820

catgtaagcc agttgtaatt gtgtttgcca acagcttgca caggtgtatt cacctcaaac 2880
 cgtacaacgt ttaaacaca ccagtttgca aagtcctggt ctcccacagg actttgcccc 2940

 taacttgttc agcagcattc aacgetgcca caaaaataaa atggactaag ttcgcttagc 3000
 ttctttatct ctgtgctgca atgatctctc aaactttaaa tcagcgcaaa agtaaaaagt 3060
 ccgttgtgac acggggacct aagcagagtt ctctattttc tttcgtagga aagcttctgt 3120
 gtagcgatat gaaggcaata aaaaagccca ataggcaatt aatgcatatc gggcttaatc 3180
 aatcaattat taaagcaggt gatgtctgcc tcgtgaagaa ggtgttgctg actcatacca 3240
 ggctgaatc gccccatcat ccagccagaa agtgaggag ccacggttga tgagagcttt 3300
 gttgtaggtg gaccagttgg tgattttgaa cttttgcttt gccacggaac ggtctgcgtt 3360

 gtcggaaga tgcgtgatct gatccttcaa ctgagcaaaa gttcgattta ttcaacaag 3420
 ccgccgtccc gtcaagtcag cgtaatgctc tgccagtggt acaaccaatt aaccaattct 3480
 gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt tattcatatc aggattatca 3540
 ataccatatt ttgaaaaag ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc 3600
 cataggatgg caagatcctg gtatcggctc gcgattccga ctgctccaac atcaatacaa 3660
 cctattaatt tcccctgctc aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg 3720
 actgaatccg gtgagaatgg caaaagctta tgcatttctt tccagacttg ttcaacaggc 3780

 cagccattac gctcgtcacc aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat 3840
 tgcgcctgag cgagacgaaa tacgcgatcg ctgttaaaag gacaattaca aacaggaatc 3900
 gaatgcaacc ggcgcaggaa cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga 3960
 tattcttcta atacctggaa tgctgttttc ccggggatcg cagtggtag taacatgca 4020
 tcatcaggag tacggataaa atgcttgatg gtcggaagag gcataaatc cgtcagccag 4080
 tttagctga ccactcacc tgtaacatca ttggcaacgc tacctttgcc atgtttcaga 4140
 aacaactctg gcgcatcggg cttcccatac aatcgataga ttgtcgacc tgattgcccg 4200

 acattatgc gagccattt ataccatata aatcagcat ccatgttgga atttaatgc 4260
 ggccctgagc aagacgtttc ccgttgaata tggctcacc cattctcctg gatatgtaac 4320
 tcatgtttt aatcgtttat ctcttgaatt ttctcaata aagcaatcga ttcaaatgt 4380
 tctgtgtgca taaacatgca cataaccgct gctttttta actggttaacc atgttgaacc 4440
 aaaacacctg catcccttgc taatgttgct ggattacatg atacataaac gattcttttt 4500
 gctccaaagt tcggcacata ctgcataatt tcatatgac cagcagagg aggatcaatc 4560

aataatgcat caaatccttg atttgcccaa gaatgatgcg aaaaatcttt tgttaaatct 4620

tgtgaaaaga agcttgcttg caccagatta ttacgctttg cattatctgt tgcccctgc 4680
accatttctt cacttgetgc cttaataatg atcttttttg aattacteta cagttactga 4740
cttcgccaag ttacgtggct ggtcaacgtc tgtaccacgt aatacagcaa cgtgataaga 4800
caataactga actggtagc tataaatgat tggtgcaagc cattcgttta ctgctggaat 4860
atgaacgaca tgttgacggt ctttttcaac tacaccacta ttttcatcag cgaaaacgaa 4920
taattcaccg ccacgagcct gaacttcttc catatttgac ttaagcttat caagcatttc 4980
gtcatttggg gcaagaatca cgattggcat ttcagtatca acaagtgcc aatgggcccgtg 5040

ttcaactca ccagctgcat aaccttctgc gtgaatatat gaaatttctt taagctttaa 5100
tgcaccttc aaagcgattg gatagtgtg gccacggcct aagaataaac agtgttgttt 5160
ttcaacgaac aattctgata aacgtaaaat tctggatca ttcttaagtg tatcaagaat 5220
cactttcggg ctatgccaca attcacgagc aagctcttca atcatcacat tgctaatacg 5280
ctgtttcact tgaccaattt tcaagattaa caacattaat gcagcaagct gagtcgtgaa 5340
cgcttttgtt gatgcaacce caatctctgg gctgcaagc gteaataagt ggtgatcagt 5400
ttcacgcacc attgaagaag ttgcgacgtt acagatcgtt aaagtctgaa tatcgatatt 5460

at ttgcttta gcacgttttt gagtttcacg tagtgcagct aaggtatccg ctgtttcgcc 5520
tgattgtgaa atacagatgt aaagtgtatt ttccacaatc actggtgagc gataacggaa 5580
ttcactcgca atctcaact ggcaaggcac accaagtcaa ttgctcaaac caactagtga 5640
cgcgtactcg agggctgacg gtatcgataa gcttgatata cactccgcta gcgctgatgt 5700
cggcgggtgc ttttgccgtt acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg 5760
atagaacag aagccactgg agcacctcaa aaacaccatc atactactaa tcagtaagtt 5820
ggcagcatca cccgacgcac tttgcgcega ataaatacct gtgacggaag atcacttcgc 5880

agaataaata aatcctggtg tcctgttga taccggaag ccctgggcca acttttggcg 5940
aaaatgagac gttgatcggc acgtaagagg ttccaacttt caccataatg aaataagatc 6000
actaccgggc gtatTTTTTg agttatcgag attttcagga gctaargaag ctaaaatgga 6060
gaaaaaaatc actggatata ccaccgttga tatatcccaa tggcatcgta aagaacattt 6120
tgaggcattt cagtcagttg ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc tggatattac 6180
ggccttttta aagaccgtaa agaaaaataa gcacaagttt tatccggcct ttattcacat 6240
tcttgcccgc ctgatgaatg ctcatccgga attccgtatg gcaatgaaag acggtgagct 6300

ggtgatatgg gatagtgttc acccttggtta caccgttttc catgagcaaa ctgaaacgtt 6360
 ttcacgcctc tggagtgaat accacgacga tttccggcag tttctacaca tatattcgca 6420
 agatgtggcg tgttacggtg aaaacctggc ctatttcctt aaagggttta ttgagaatat 6480
 gtttttcgtc tcagccaatc cctgggtgag tttcaccagt tttgatttaa acgtggccaa 6540
 tatggacaac ttcttcgccc ccgttttcac catgggcaaa tattatacgc aaggcgacaa 6600
 ggtgctgatg ccctggcga ttcaggttca tcatgcccgtt tgtgatggct tccatgtcgg 6660
 cagaatgctt aatgaattac aacagtactg cgatgagtgg caggcggggg cgtaattttt 6720

 ttaaggcagt tattggtgcc cttaaacgcc tggttgctac gcctgaataa gtgataataa 6780
 gcggatgaat ggcagaaatt cgaaagcaaa ttcgaccggg tcgtcggttc agggcagggt 6840
 cgttaaatag ccgcttatgt ctattgctgg tttaccggtt tattgactac cggaaagcagt 6900
 gtgaccgtgt gcttctcaaa tgccctgaggc cagwttgctc agctctcccg tggaggtaat 6960
 aattgacgat atgatcattt attctgcctc ccagagcctg ataaaaacgg ttagcgcttc 7020
 gttaatacag atgtagggtt tccacagggt agccagcagc atcctgcgat gcagatcatc 7080
 gaattcctgc agccaagcta gacctaggcc ttaagatcct ttttaacceca tcacatatac 7140

 ctgccgttca ctattattha gtgaaatgag atattatgat attttctgaa ttgtgattaa 7200
 aaaggcaact ttatgcccat gcaacagaaa ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaac 7260
 agatagattt tttagtctt taggcccgtt gctcgcaaat ccttttatga ttttctatca 7320
 aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga 7380
 aaagtaaatc gcgcgggttt gttactgata aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg 7440
 caaagtgtat acittggcgt caccctttac atattttagg tcttttttta ttgtgcgtaa 7500
 ctaacttgcc atcttcaaac aggagggtg gaagaagcag accgctaaca cagtacataa 7560

 aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct 7620
 ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaaccaa 7680
 agccatataa gaaacatac ggcatttccc atattacag ccatgatatg ctgcaaatcc 7740
 ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag ttctgaatt cgattcgtcc acaattaaaa 7800
 atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt gggacagctg gccattaca aacgctgacg 7860
 gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa 7920
 atgcgatga cacatcgatt tacatgttct atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca 7980

 gctggaaaaa cgctggccgc gcttttaaag acagcgacaa attcgatgca aatgattcta 8040
 tcctaaaaa ccaaacacaa gaatggtcag gttcagccac attfacatct gacggaaaaa 8100
 tccgtttatt ctacactgat ttctccggtt aacattacgg caaacaaca ctgacaactg 8160

cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct ctttgaacat caacgggtga gaggattata 8220
aatcaatctt tgacgggtac ggaaaaacgt atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag 8280
gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc tgagagatcc tctactacgta gaagataaag 8340
gccacaaata cttagtattt gaagcaaaca ctggaactga agatggctac caaggcgaag 8400

aatctttatt taacaaagca tactatggca aaagcacatc attcttccgt caagaaagtc 8460
aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca cggctgagtt agcaaacggc gctctcggtg 8520
tgattgagct aaacgatgat tacacactga aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta 8580
acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga acgtctttaa aatgaacggc aatgggtacc 8640
tgttactga ctcccgcgga tcaaaaatga cgattgacgg cattacgtct aacgatattt 8700
acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa ctggccata caagccgctg acaaaaactg 8760
gccttgtgtt aaaaatggat cttgatacta acgatgtaac ctttacttac tcacacttgc 8820

ctgtacctca agcgaagga aacaatgtcg tgattacaag ctatatgaca aacagaggat 8880
tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc caagcttccct gctgaacatc aaaggcaaga 8940
aaacatctgt tgcataagac agcatccttg aacaaggaca attaacagtt acaaaataaa 9000
aacgcaaaag aaaaatgccg taccctatng gcattttctt ttatttctta tcaacataaa 9060
ggatgaatccc atatgaacta tataaaagca ggcaaatggc taaccgtatt cctaaccttt 9120
tgtaaatgac tcaacttat tgatagtgtt ttatgttcag ataatgccg atgactttgt 9180
catgcagctc caccgatatt gagaacgaca gcgacttccg tcccagccgt gccaggtgct 9240

gcctcagatt caggttatgc cgctcaattc gctgcgtata tcgcttgcg attacgtgca 9300
gctttccctt caggcgggat tcatacagcg gccagccatc cgtcatccat atcaccacgt 9360
caaagggtga cagcaggctc ataagacgcc ccagcgtcgc catagtgcgt tcaccgaata 9420
cgtgcgcaac aaccgtcttc cggagactgt catacgcgta aaacagccag cgctggcgcg 9480
atttagcccc gacatagccc cactgttcgt ccatttccgc gcagacgatg acgtcactgc 9540
ccgctgtat gcgcgaggtt accgactgcg gcctgagttt ttaagtgcg gtaaaatcgt 9600
gttgaggcca acgcccataa tgcgggctgt tgcccggcat ccaacgcat tcatggccat 9660

atcaatgatt ttctggtcgc taccgggttg agaagcggtg taagtgaact gcagcaatgg 9720
caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 9780
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 9840
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 9900
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacag acggggagtc 9960
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 10020

attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta tggatgactc 10080

tcaagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagta tacactccgc tatcgtctacg 10140

tgactggggtc atggctgcgc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc 10200

ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg 10260

tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgaggcag caaggagatg ggcaccaaca 10320

gtcccccgge cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgtc atgagcccga 10380

agtggcgagc ccgatctcc ccatcgggtga tgcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac 10440

ctgtggcgcc ggtgatgccg gccacgatgc gtcggcgta gag 10483

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer - GlmS_Up_F_spe I

<400> 7

ggactagttg gtttgagcaa ttgacttgg 29

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer - GlmS_Up_R

<400> 8

cttcacttgc tgccttaata atgatctttt ttgaattact ctaca 45

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer - A1S_0579p_F

<400> 9

gtaattcaaa aaagatcatt attaaggcag caagtgaaga aatggtgcag 50

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer - AIS_0579p_R
 <400> 10
 tggctcatac cattctcctg gatatgtaac tc 32
 <210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer - Npt I_F
 <400> 11
 caggagaatg gtatgagcca tattcaacgg gaaa 34
 <210> 12
 <211
 > 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer - Npt I_R
 <400> 12
 gcaggtgatg tctgcctcgt gaagaagg 28
 <210> 13
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer - GlnS_Down_F
 <400> 13
 aggcagacat cacctgcttt aataattgat tgattaagc 39
 <210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer - GlnS_Down_R_Apa I
 <400> 14
 gttgggccca gtcggtttta gcagaccg 28
 <210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer - A1S_0579p_F_pst I

<400> 15

aactgcaggc aagtgaagaa atggtgcag 29

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer - Npt I_R_pst I

<400> 16

aactgcaggt ctgcctcgtg aagaagg 27