

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 1)

(11)特許番号

特許第3044303号
(P3044303)

(45)発行日 平成12年5月22日(2000.5.22)

(24)登録日 平成12年3月17日(2000.3.17)

| | | | |
|--------------------------|-------|---------------|---------|
| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | |
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| // (C 1 2 N 15/09 | Z N A | | |
| C 1 2 R 1:46) | | | |

請求項の数2(全10頁)

| | |
|--|--|
| <p>(21)出願番号 特願平10-347017</p> <p>(22)出願日 平成10年12月7日(1998.12.7)</p> <p>審査請求日 平成10年12月7日(1998.12.7)</p> <p>微生物の受託番号 FERM P-17008</p> <p>微生物の受託番号 FERM P-17009</p> | <p>(73)特許権者 390026169 農林水産省畜産試験場長 茨城県稲敷郡茎崎町池の台2</p> <p>(72)発明者 中村 睦 茨城県牛久市上柏田3-52-1 C-202</p> <p>(72)発明者 日野 常男 神奈川県相模原市鶴野森1-28-24 F5-204</p> <p>(74)代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔 (外1名)</p> <p>審査官 深草 亜子</p> |
|--|--|

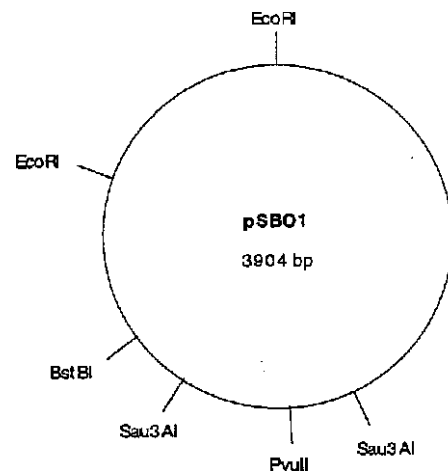
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プラスミド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の制限酵素地図を有する3904bpのプラスミドであって、ストレプトコッカス・ポピス由来の自己複製配列を含むプラスミド。

【化1】



【請求項2】 以下の(a)又は(b)のDNAを含むプラスミド。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなる DNA
 (b) 配列番号1で表される塩基配列からなる DNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ自己複製をすることができるDNA

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ルーメン微生物より分離したプラスミドに関する。

【0002】

【従来の技術】反すう家畜は4つの胃を持っており、このうち食べた飼料が最初に入る胃をルーメンという。ルーメンには、細菌、繊毛虫、真菌などの反すう家畜と共生しているルーメン微生物が多数生息している。ところで、遺伝子組換えを行うためには、外来遺伝子を微生物の遺伝子に運ぶ役割を担うベクターと、そのベクターを受け入れる微生物(宿主)とが必要である。従って、遺伝子組換えによって新たな機能を有するルーメン微生物を開発するためには、ルーメン微生物による宿主-ベクター系を作製する方法が考えられる。

【0003】ベクターとして利用できるものには、プラスミド、ファージ、トランスポゾンなどが挙げられるが、プラスミドが最も扱いやすく、開発も容易である。プラスミドは、宿主の染色体とは物理的に独立して存在するDNAであるが、複製して遺伝する能力は宿主に大きく依存しているため、特定の宿主においてのみ増殖する。従って、ルーメン微生物による宿主-ベクター系を作製するためには、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドが必要である。

【0004】

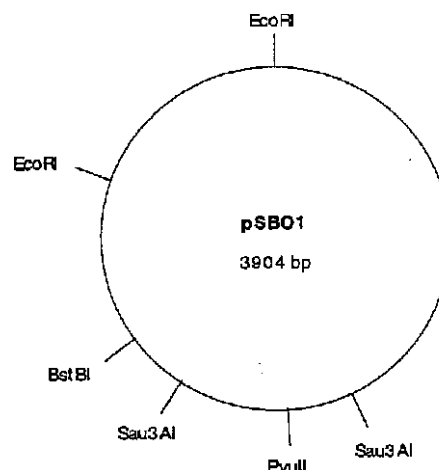
【発明が解決しようとする課題】本発明は、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドを提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、ルーメン内で多種類の可溶性糖類やデンプン、ペクチン、タンパク質などを分解する細菌、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*) よりプラスミドを分離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、下記の制限酵素地図を有する3904bpのプラスミドである。

【0006】

【化2】



【0007】上記プラスミドとしては、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものが挙げられる。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなる DNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ自己複製をすることができるDNA

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明のプラスミドは、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*) より分離されたものであり、大腸菌内で複製することができる任意の配列と本発明のプラスミドとを結合させることにより、大腸菌内での自己複製が可能である。従って、本発明のプラスミドに外来遺伝子を挿入し、大腸菌を形質転換させて大量の組み換えプラスミドを得、該組み換えプラスミドを用いてストレプトコッカス・ボビスを宿主菌として有用物質を産生することが可能となる。本発明のプラスミドは、例えば以下の通り作製される。

【0009】まず、反すう動物(例えばウシ、ヒツジ、ヤギ等)のルーメンからストレプトコッカス・ボビスを採取する。採取方法は以下の通りである。すなわち、ルーメン液を希釈し、ストレプトコッカス選択培地(TATAC寒天培地)を用いて嫌気性ロールチューブ法によりコロニーを出現させる。コロニーから釣菌し、PCR法により選択された菌の16SrRNA配列を決定する。この決定された配列と、データベースに登録されているストレプトコッカス・ボビスの16SrRNA配列(GenBankアクセッションNo. X58317)とを比較し、両者の配列間において近似する配列を有する場合は、採取した菌がストレプトコッカス・ボビスであると判断(確認)する。

【0010】本発明においては、市販のストレプトコッカス・ボビス菌株を入手してもよい。次に、得られたストレプトコッカス・ボビスから全DNAを得る。全DNAは、公知の任意の手法(例えば染色体DNAのmini-scale調整法(「新しい遺伝子操作技術の基礎」、大田美智男、菜根出版 pp23-25, 1989年)により得ることができる。

【0011】得られた全DNAをアガロースで電気泳動

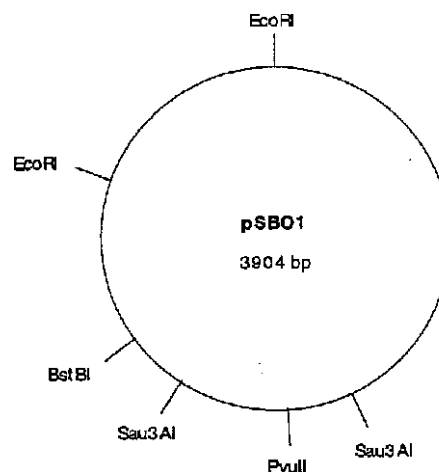
後、プラスミドのバンドを切り出して得る。このストレプトコッカス・ボビスのプラスミドを、適当な制限酵素（例えばEcoRI、Sau3AI）で消化して部分断片とし、これをpBluescriptなどのベクターに挿入した後、大腸菌を形質転換させる。アンピシリン耐性、白コロニーとなったものを選択し、これにより各々プラスミドDNAを分離して遺伝子ライブラリーとする。適当なプライマー、例えばM13M4プライマー及びM13リバースプライマー（いずれもTaKaRa社）を用いて上記ライブラリーを鋳型としてPCRを行う。

【0012】得られた増幅断片をアガロースで電気泳動後、メンブレンにブロットングし、ストレプトコッカス・ボビスのプラスミドをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行う。サザンハイブリダイゼーションは、Boehringer Mannheim社のマニュアルに従って行うことができる。サザンハイブリダイゼーションの結果に基づいて、ストレプトコッカス・ボビスのプラスミド断片を持つ遺伝子ライブラリー中のプラスミドを選択し、その挿入断片の塩基配列の決定を行う。本発明のプラスミドの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)] により決定することができるが、通常は、ABI社の自動塩基配列決定装置を用いて分析及び決定される。

【0013】このようにして得られたプラスミドは、3904 bp の長さを有し（配列番号1）、ストレプトコッカス・ボビス由来の自己複製配列を含むものである。但し、本発明のプラスミドは、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAを含むもののほか、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ自己複製をすることができるDNAを含むものも本発明のプラスミドに含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が75～100mM、好ましくは75mMであり、温度が40～42℃、好ましくは40℃の条件をいう。また、本発明のプラスミドは、以下に示す通り、制限酵素部位としてBstBI及びPvuIIを1カ所、EcoRI及びSau3AIを2カ所有するものである。

【0014】

【化3】



【0015】なお、各制限酵素部位間の距離は、BstBI及びPvuIIで切断した場合は、長い断片が3283 bp、短い断片が621bpであり、EcoRIで切断した場合は、長い断片が3103bp、短い断片が801bpであり、Sau3AIで切断した場合は、長い断片が3271bp、短い断片が633bpである。

【0016】以上のようにして得られたプラスミドを「pSB01」と命名し、該プラスミドを含む大腸菌（名称：「E.coli pSB1E1」及び「E.coli pSB1E2」）は、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成10年9月28日付で、E.coli pSB1E1についてはFERM P-17008として、E.coli pSB1E2についてはFERM P-17009としてそれぞれ寄託されている。なお、大腸菌 pSB1E1にはpSB01のうち第2～3104番目までの断片が含まれている（図1において2番から時計回りに3104番まで）。また、大腸菌 pSB1E2にはpSB01のうち、第3105～1番目までの断片が含まれている（図1において3105番から時計回りに1番まで）。従って、pSB1E1に含まれるプラスミド及びpSB1E2に含まれるプラスミドともに制限酵素EcoRIで処理し、両者をリガーゼ等により連結することにより完全型のプラスミドpSB01を得ることができる。

【0017】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕プラスミドの調製

菌株はストレプトコッカス・ボビスJB1を用いた。

【0018】菌の培養は、Scott and Dehorty 培地を用い、37℃で4時間行った。培養液10mlから遠心分離（5000rpm）によって菌体を回収し、25mg/mlのリゾチームを100μl加えて懸濁した後、37℃で10分静置した。その後、TESKEDバッファー（200mM Tris-HCl, pH8.0, 20mM EDTA, 2%ドデシル硫酸ナトリウム, 2mg/mlプロテイナーゼk, 25mMジチオスレイトール）を500μl加えて室温にて10分静置し、溶菌させた。得られた溶菌液に500μlのフェノールを加え、穏やかに攪拌し、遠心分離によ

て水層を回収した。等量のフェノール・クロロフォルムにより、DNAの抽出を行った後、エタノール沈殿を行った。

【0019】50 μ lのTEバッファー (pH8.0) にDNAを溶解し、RNaseを混合して0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。プラスミドのバンド (1kbpラダー (BRL) で2.0 ~ 4.0kbp 付近) をゲルから切り出し、フェノール融解法によってプラスミドDNA を抽出精製した。

【0020】〔実施例2〕 制限酵素地図の作製
プラスミド pSB01を制限酵素EcoRI及びSau3AIで処理したところ、少なくとも2箇所以上で切断できることが明らかになった。そこで、EcoRI及びSau3AI処理したプラスミドDNAを、同じEcoRI及びSau3AI処理しアルカリフォスファターゼ処理したpBluescript SK+ (Stratagene, USA) に連結し、大腸菌 JM109を形質転換した。形質転換体をアンピシリンによる選択にかけて白コロニーを選択し、形質転換体からプラスミドを抽出した。

【0021】形質転換体のプラスミドDNA をテンプレートとして、M13-M4プライマー及び M13リバースプライマー (TakKaRa) を用いてPCRを行った。PCRは、TakKaRa EX Taqのキットを用い、説明書に従って反応液を調製し、94 30秒、55 30秒、72 2分の反応を1サイクルとして30サイクル行った。得られた増幅断片をアガロースゲルで電気泳動後、メンブレンにブロッティングし、サザンハイブリダイゼーションを行った。なお、サザンハイブリダイゼーションはBoehringer Mannheim社のマニュアルに従った。

【0022】また、プローブは、ストレプトコッカス・ボビスのプラスミドDNA をDIG HighPrime (Boehringer Mannheim) で標識したものをを用いた。サザンハイブリダイゼーションの結果、シグナルの認められた陽性クローンpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1及びpSE1S2が得られた。これらの形質転換体のプラスミドをテンプレートとし、プライマーを用いて、Li-COR4000L DNAシーケンサーにかけて塩基配列を解析した。

【0023】プラスミドpSB01の領域内において、pSE1E1、pSE1E2、pSE1S1及びpSE1S2のプラスミドでは塩基配列を解析できなかった領域が存在したため、その領域については、pSE1E1、pSE1E2、pSE1S1及びpSE1S2より決定した塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて塩基配列の決定を行った。なお、プライマーは、Oligoプログラム (National Biosciences, UK) を用いて、以下の順向きのプライマー (PF01 ~ PF04) 及び逆向きのプライマー (PR01 ~ PR04) を合計8個設計し、合成した。

【0024】

PF01 : GGGAGGTGTGTAGTGTG (配列番号2)

PF02 : ACTGCTGAAGAGATGAAT (配列番号3)

PF03 : TGAACAATGGGAAAGTGC (配列番号4)

PF04 : AATCCCCTTTTGGACACT (配列番号5)

PR01 : GCATACAGACGATTTTAG (配列番号6)

PR02 : CTTATCGTCTTCCCACTC (配列番号7)

PR03 : CTTTACAATTTTCGTTAGC (配列番号8)

PR04 : GTCCACACTTGCTAATCT (配列番号9)

【0025】ストレプトコッカス・ボビスのプラスミドDNAをテンプレートとし、上記の合成プライマーを用いてABI社の373Sシーケンサーにかけて解析した。さらに、決定した塩基配列を基に、以下のプライマーを設計・合成し、塩基配列を決定した。

PF05 : ATCTTACTTGTGTGCT (配列番号10)

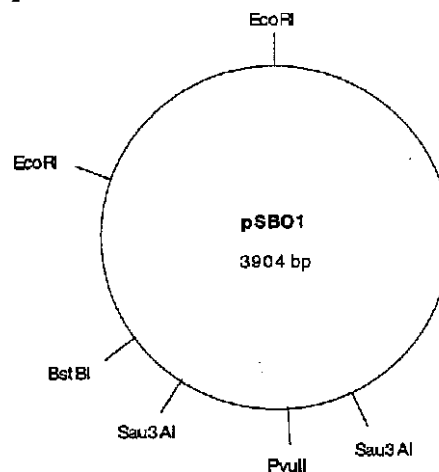
PR02 : TTCTTTTTCATAATCTCC (配列番号11)

その結果、配列番号1で表される3904 bpの塩基配列が得られた。

【0026】得られた塩基配列を基にGENETYX-MAC (SD Cソフトウェア開発株式会社、日本) を用いて解析し、制限酵素部位の推定を行った。単一の制限酵素部位しかないと考えられた制限酵素BstBI部位及びPvuII部位については、プラスミドDNA に対し、当該制限酵素の単独消化、あるいは二重消化を行い、電気泳動することで確認した。その結果、本発明のプラスミドは以下に示す制限酵素地図を有するものであることがわかった。

【0027】

【化4】



【0028】

【発明の効果】本発明により、ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドが提供される。本発明のプラスミドは、ストレプトコッカス・ボビスと大腸菌とのシャトルベクターとして利用できる点で有用である。

【0029】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

<;120>; Plasmid

<;130>; P98-0356

<;140>;

<;141>;

<;160>; 11

<;170>; PatentIn Ver. 2.0

<;210>; 1

<;211>; 3904

<;212>; DNA

<;213>; Streptococcus bovis

<;400>; 1

```

gaattcctaac gaaagtttta aagcaaacgg aaaaatatat attactcctg ctggagtaga 60
aaaaatcaaa agtggtttga gaaaagataa agagttctat tctgttactt tcgagagtaa 120
attgatgagc caaatagatg acttaaggtc aaatcagtg gaccatgaat ggaaattaga 180
agacgtttct aaaaaattag atagcattga taaaaaacta gatgaaattt taaaacgtct 240
ctaaaaatcgt ctgtatgcca ttttaaaatc atttttgacg aattatacct tttttagtct 300
aaaactccat acagaggcta ataaggaact taaaatcaat ttttaagcaaa aatctatgat 360
agatTTTTGA gatataTTTT ttatttgaag aatgatataa taatTTTTGG caactaaaaa 420
cccccaatcg cctgcaagg gaggtgtgtt agtgtgctat accaaatTTT acttttcgTT 480
gttattcgca atagatttaa ctatgttgtt attcctttag cacagctata cggaacaaaa 540
tgatagaga agcattttga tgacaatgaa aaatagttgt ccttctctga gacgttgcaa 600
ggttgtgagc aacgataaaa aaagcaccct agcttttggc cggcaggggtg cttttcttgt 660
gttagattta taccaaatct tacttgttgt tgcttatatt atagcatgaa atagtttttt 720
aagtcaaaaa agtagtgttt gaggaacact acttaggaga ttatgaaaaa gaaaagtttt 780
aggattatct aaataataac gctagaaatt taagaaaac taaaaaatga aaaaaataac 840
tagcagattg acgatttttt ttcgcagaaa aaatcaaaa ctgagtggtt atatatgttt 900
aatatatgtt taatatatgt ttaggagact cacgagcctt acagcccaaa gggatttcaa 960
gttttatcaa gtacaaaatg tcggtttatc aagtacaaaa tgcggttta tcaagtacaa 1020
aatgtcggtt tatcaagtac aaaatgtcgg ttattaata cacttttttt atttgtatta 1080
ataacaaaaa atcgatataa taaatacaat taataaaaga ggtatttata tggctaacga 1140
aattgtaaag catcataacg atttaatac agtcattatg cgaaagtgga ctgctgaaga 1200
gatgaatttc ttctttgcaa taattgctaa agctagaaat caagggacta aagaattggt 1260
atttgataaa tatcaattag ctgatttagc aaactatagt ctggaacaca atcaacgttt 1320
ttatgaaca atggataatt tagctaataa tatcagtaaa ttaagatata ttgaacgaac 1380
aagccattct gtagattata tggctttatt tacaagattt aaagtgaat ggacagaaga 1440
tttatcagac atgaaagcta cagtcagtat ttctgataaa tttgagtata tagtcaataa 1500
acttgaagct aatttcactc aatatgaact tgaagaattt actagtatcc gttcaactta 1560
tgctaaaact gcttatcgtt tgttaaaaca atggcgtaca atagggaaaa aagaatTTTc 1620
aaaagaagag tttaaaatgt tgatggatac tccgatatat tatcaagtaa gtgatattga 1680
tcgatttagc attaaaccta ttttgaaaga attaagccaa tattttatgg ggctaaaagt 1740
taagaaaaatc aaatcaaata aacgtggaaa ccctgtttta ggctatgaat ttacatggaa 1800
accagaaaaa actggagagt gggaagacga taagtacaag aaaaacgact ttataagcc 1860

```

taaaaatagt gcctcaaatg taccagattg ggtagaaaa gagtacaac atagtgcgac 1920
 agctgaagaa caagcgaaac ttgaagaatt aagacgtagt atgtctgaag attagtggca 1980
 ttttgttatt gataaaactt gaaatccctt ggggctgtaa ggcttatggc gttataaagt 2040
 acaaaaatgtc ggtatgtttt tataacgttt tagtggagga atattatgac tgaagaaac 2100
 gaactatta acgatattca acgacttaaa gcagaacgta atcgattgtt agaacaatt 2160
 aaagaggctg aacaatggga aagtgcctct tgggatagct atcacgcatt agtagaacat 2220
 ataatgcca tggagaaaa gcaaaaaata gctagaaact actggaatac atctcaaca 2280
 gatattaaat tacagtttga gtctgttctg gatcaaaata acaggctcaa aaaggttatt 2340
 gctaaaaagc gttatgactt attagaaagt gaattagata agcttacaga agaagtata 2400
 cagttagcag acgttttagg aattgaaatc gatgaacttc ctcaagattt gccatttttt 2460
 gccttacctg cagaggagat agataatgag taaaacgatt aaagagattg cagatgaact 2520
 tgggttttca aaaaccacca ttcgaaataa aatgactgct gatttttagga aaaaatgggt 2580
 gaaactttg accgcaaacg ggggtcaaac cttagttatc accgaagaag gtgtaaatgc 2640
 cttaaaatca atatttagag gtgaaaacta tactgcaaac tttaccgaaa accagtttgc 2700
 acctaacgaa gatttaaaag ccgaattaaa agctaaaaat gagcagatag aaagtcctca 2760
 aaaatgctc gaccaatctc aacaattgct acttagtgag cagaaaaaaa gtcaattgct 2820
 gatagaaaat cagactccta aaactgaggt ggctcgcgag tggcaagaaa aacaagaagt 2880
 gctagaaaat caaatatctc attatcgtaa ttcggctaata aacgctaata aacgagtaag 2940
 agagtataca gattgggcag agcgcagaga aaaagctttt tggtttgag ctattttagc 3000
 aggagttttc tttgttttat tacttgtttt aggtggagta tactttttgg ggagaaatta 3060
 attatgatag gacagccaaa atttaaaata aaagatttag tcgaattctc ttttaacggt 3120
 tctaaaaggt ttgggactat tatcatagtc gatgcttttg gaacttttag gcaatctgat 3180
 gaagtgtctt acgatattat cgatttagac agaattggtga tgtgtaagca cgtagtagag 3240
 tcggatattt tcccaccaga ttcgcaagct ttaaaggagc ttttagcaac taaagaaatt 3300
 ccttttagaca tgcgggagtg gttaaatcaa taatctaaca agccccaata gtaggggctt 3360
 ttcgtatgct cggtaacctg acttctttc taaaaatctg ataaaaatgga gctttttgcc 3420
 cagcccctag aggaggtcta ctttcatact ggcaagatta gcaagtgtgg acacacttac 3480
 gaaaaataaa agcaaaaaag cctatttcta gggcaccccc acaaacagac ttttgacttt 3540
 ttacactttg gggaaatccc caatcccctt tttgacactt cgtgcatttt tcaaaaatta 3600
 cagttctgtt ttaagaggg gtttggggta taccacaaga aaatatttta tcagcgtgtg 3660
 gggacttac tagtaagtg tgcaccagc gctaactctg ccggagtgaa agattatgat 3720
 aaaatataaa atagcacaag tggtaaacct actggtaagt tgtcacacac ttgctacgct 3780
 tgccagatgg aaacaaggag gtaaagaaca tgtatgaagc agcaggatc ggaaaaacaa 3840
 tgttgaagt ctctaaagaa ctagggtgat ctaaagagc ggtaaaatc caccaacgca 3900
 aat 3904

<;210>; 2

<;211>; 18

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 2

gggaggtgtg ttagtgtg

18

<;210>; 3

<;211>; 18

<;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 3
 actgctgaag agatgaat 18

<;210>; 4
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 4
 tgaacaatgg gaaagtgc 18

<;210>; 5
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 5
 aatccccttt ttgacact 18

<;210>; 6
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 6
 gcatacagac gattttag 18

<;210>; 7
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 7
 cttatcgtct tcccactc 18

<;210>; 8
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 8
 ctttacaatt tcgtagc 18

<;210>; 9
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 9
 gtccacactt gctaatct 18

<;210>; 10
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;
 <;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
 pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 10
 atcttacttg ttgttgct 18

<;210>; 11
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Oligonucleotide designed based on the sequence of plasmids
pSE1E1, pSE1E2, pSE1S1 or pSE1S2.

<;400>; 11
ttctttttca taatctcc

18

【0030】

【配列表フリーテキスト】配列番号2：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号3：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【0031】配列番号4：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号5：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号6：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【0032】配列番号7：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号8：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号9：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【0033】配列番号10：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計された

オリゴヌクレオチド。

配列番号11：プラスミドpSE1E1、pSE1E2、pSE1S1又はpSE1S2の塩基配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチド。

【図面の簡単な説明】

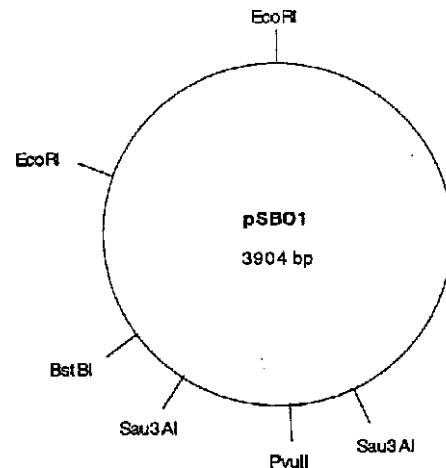
【図1】 本発明のプラスミドを示す図である。

【要約】

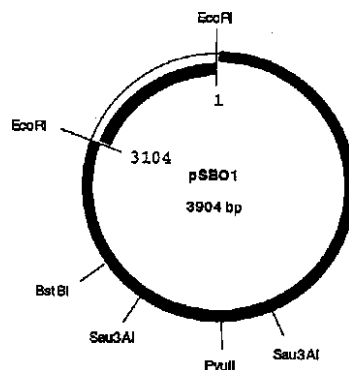
【課題】 ルーメン微生物内で増殖できるプラスミドの提供

【解決手段】 下記の制限酵素地図を有し、ストレプトコッカス・ボビス由来の自己複製配列を含むプラスミド。

【化1】



【図1】



フロントページの続き

(56)参考文献 特許2992635(JP, B1)
Applied and Environmental Microbiology (1997) 63[5] p. 1701 - 1711

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)
C12N 15/74
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
BIOSIS(DIALOG)
WPI(DIALOG)