



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 631**

(51) Int. Cl.:  
**G01N 33/24** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02799414 .4**

(86) Fecha de presentación : **19.09.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1430301**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

(54) Título: **Procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo y su empleo.**

(30) Prioridad: **21.09.2001 DE 101 46 572**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2008**

(73) Titular/es: **BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

(72) Inventor/es: **Hauer, Bernhard;**  
**Matuschek, Markus;**  
**Schmid, Rolf;**  
**Buta, Christiane;**  
**Kauffmann, Isabelle;**  
**Lämmle, Katrin y**  
**Zipper, Hubert**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo y su empleo.

Es objeto de la invención un procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo, así como su empleo.

Los enzimas de microorganismos poseen un ancho potencial de aplicación. En el sector médico-farmacéutico se emplean enzimas, por ejemplo en la investigación de productos activos y el desarrollo de sistemas de ensayo de biología molecular. Se emplean enzimas en la síntesis de antibióticos y derivados de antibióticos para la obtención de hormonas, así como a modo de aditivos en la industria de productos alimenticios, en la industria de agentes de lavado, y como catalizadores para la producción de productos químicos, para citar sólo algunos ejemplos. Para mejorar los procedimientos enzimáticos actuales y explorar nuevos campos de aplicación para enzimas, se deben optimizar enzimas presentes y seleccionar nuevas enzimas en el rastreo. Hasta el momento, el rastreo de nuevas enzimas se limitó investigando exclusivamente cultivos puros de microorganismos. No obstante, se puede mostrar que únicamente de modo aproximado un 1% de todos los microorganismos son cultivables, un 99% de microorganismos no son cultivables como cepas puras con los métodos conocidos hasta la fecha. Por consiguiente, hasta la fecha, los últimos organismos se encontraban a disposición sólo para el aislamiento de nuevas enzimas. En bancos génicos de ácidos nucleicos de diferente procedencia medioambiental se incluyeron teóricamente todos los enzimas presentes en los mismos sin tener que aislar los respectivos organismos donadores. Un procedimiento para la obtención de bancos génicos a partir de muestras medioambientales debe cumplir los siguientes requisitos:

- Con el procedimiento se debe poder aislar DNA de todas las especies representadas en la muestra.
- El DNA debe estar intacto para la creación del banco génico tras el aislamiento, y no se debe deteriorar por los diferentes procesos de purificación y aislamiento.
- El procedimiento debe ser independiente de la composición de las muestras de suelo, así como de la población de microorganismos.

En este caso es crítico, por ejemplo, obtener un equilibrio entre una extensa disgregación celular por una parte, y una destrucción lo más reducida posible de DNA debido a fuerzas de cizallamiento por otra parte. Se describen ejemplos de aislamiento de DNA a partir de muestras de suelo en Moré *et al.* (Appl. Environm. Microbiol., May 1994, 1572-1580) y Zhou *et al.* (Appl. Environm. Microbiol., Feb. 1996, 316-322). Sin embargo, en este caso se extraen los ácidos nucleicos en su totalidad, es decir, de manera no selectiva, del material orgánico, o bien se aísla únicamente DNA de organismos Gram-positivos.

El DNA aislado debe ser clonable. Un problema en el aislamiento de DNA a partir de suelos es, a modo de ejemplo, que las preparaciones de ácido nucleico contienen sustancias húmicas en medida acrecentada, que impiden en gran medida, o incluso imposibilitan la preparación subsiguiente de ácidos nucleicos, por ejemplo el cuantificado o el tratamiento enzimático subsiguiente.

Además es válido asegurar que en la población de ácidos nucleicos aislada no se pierdan aquellas especies de ácidos nucleicos, que tienen escasa representación en la naturaleza, en la elaboración subsiguiente, como por ejemplo la clonación en vectores apropiados para la creación de un banco génico. Esto se puede conseguir mediante la obtención de un banco génico normalizado, en cuya creación se empobrecen especies de DNA frecuentemente presentes, y se enriquecen especies de DNA presentes con menor frecuencia.

Por la literatura son bastantes conocidos métodos para el enriquecimiento de especies de DNA presentes con poca frecuencia: a modo de ejemplo se citan WO 95/08647, WO 95/11986, WO 97/48717 y WO 99/45154.

La WO 95/08647 da a conocer en primer lugar la obtención de un banco génico de cDNA en un vector apropiado, y la puesta a disposición de plásmidos en su forma de hebra simple mediante desnaturalización. A continuación se efectúa la obtención de fragmentos que son complementarios a regiones 3' no codificantes de los plásmidos de hebra simple, así como su hibridación con un banco génico de cDNA. En este caso, la selección se basa en el principio de que las zonas 3' no codificantes, frente a zonas de DNA codificantes que están frecuentemente conservadas, están representadas con menor frecuencia en el genoma desde el punto de vista estadístico. Los híbridos formados se purifican y se someten a otros ciclos de desnaturalización y reasociación. No obstante, el procedimiento descrito anteriormente exige conocimientos detallados respecto a las secuencias de nucleótidos no codificantes. La WO 95/08647 persigue el objetivo de poner a disposición un catálogo de cDNA humano normalizado. En este caso se parte de células de mamíferos, en especial de células de cerebro, pulmón o corazón. El aislamiento de DNA genómico microbiano a partir de muestras de suelo no se menciona, más bien, el material de partida de la WO 95/08647 es mRNA aislado.

La WO 95/11986 da a conocer un procedimiento para la obtención de un banco génico de cDNA sustractivo, en el que, en un primer paso, se clona en un vector el DNA total presente en forma de cDNA a continuación se desnaturaliza este DNA, y el cDNA de hebra simple se emplea para la hibridación con la molécula de ácido nucleico marcada específicamente, que se debe sustraer de la totalidad de DNA. Mediante la separación de híbridos de DNA marcados

formados se produce un banco de DNA sustractivo. No obstante, de este modo no se consigue un enriquecimiento de especies de ácidos nucleicos presentes con menor frecuencia en el banco de DNA remanente. Además se aísla el DNA de células de mamíferos, en especial células tumorales, empleado en este caso, siendo el material de partida empleado mRNA aislado. El aislamiento de DNA microbiano genómico y su normalización no se mencionan.

Frente a los métodos explicados hasta la fecha para la obtención de bancos génicos sustractivos por medio de hibridación con sondas obtenidas a tal efecto o fragmentos de ácido nucleico, en la WO 97/48717 se da a conocer la obtención de un banco génico de DNA normalizado, empleándose como material de partida DNA genómico de organismos no cultivables, por ejemplo de muestras de suelo. En este caso, se aísla el DNA mediante proteinasa K y el procedimiento "freeze-thaw", a continuación se purifica a través de un gradiente de CsCl, y se enriquece a través de PCR, la complejidad del banco génico se investiga mediante análisis de 16S-rRNA, y finalmente se normaliza durante 12-36 horas a 68°C mediante desnaturalización y reasociación. No obstante, este documento US presenta la deficiencia de no indicar cuando se produce el momento óptimo para la conclusión de la reasociación, lo cual, no obstante, es decisivo para el rendimiento óptimo de especies de DNA representadas con poca frecuencia. Esto último es válido igualmente para el documento WO 99/45154.

Además, en la puesta a disposición de un banco génico normalizado es problemático que la disponibilidad de puntos de reconocimiento apropiados para endonucleasas de restricción está fuertemente limitada en un vector con el fin de clonación de fragmentos de DNA. Esto se basa sobre todo en que los fragmentos de DNA aislados que comprenden un determinado intervalo de tamaños no se deben fragmentar de nuevo en el transcurso de la preparación para la clonación. Por este motivo, los fragmentos de DNA aislados se someten a una metilación enzimática en procedimientos convencionales, mediante lo cual se debe proteger el DNA del ataque de endonucleasas de restricción. No obstante, es problemático que esta metilación es muy costosa, y además no se efectúa distribuida de manera uniforme a través del DNA total con una seguridad del 100%, de modo que la protección ante el ataque de endonucleasas de restricción es insatisfactoria en la práctica (Robbins, P.W. *et al.* (1992) *Gene* 111 : 69 - 76).

Es tarea de la presente invención poner a disposición un procedimiento para la obtención de bancos génicos, y proporcionar vectores génicos a partir de organismos tanto no cultivables, como también cultivables. El procedimiento según la invención ofrecerá en especial la posibilidad de obtención de bancos génicos a partir de muestras de suelo, para poner a disposición también DNA presente con menor frecuencia a partir de organismos no cultivables en laboratorio. Otra tarea de la presente invención es la identificación de nuevos biocatalizadores a partir de muestras de suelo.

Según la invención, este problema se soluciona mediante un procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo,

- a) extrayéndose ácidos nucleicos de seres vivos contenidos en muestras de suelo,
- b) efectuándose una fragmentación de ácidos nucleicos,
- c) efectuándose una cuantificación de fragmentos de ácido nucleico por medio de colorantes fluorescentes,
- d) efectuándose una normalización de fragmentos de ácido nucleico, desnaturalizándose en primer lugar los fragmentos de ácido nucleico, y siguiéndose el desarrollo de la renaturalización por medio de colorantes fluorescentes,
- e) efectuándose una separación de ácidos nucleicos presentes en doble hebra de los ácidos nucleicos presentes en hebra simple mediante cromatografía de absorción una vez concluida la renaturalización, presentándose las especies de ácido nucleico contenidas en la fracción de ácidos nucleicos de hebra simple aproximadamente con la misma frecuencia (normalizada),
- f) clonándose las especies de ácido nucleico normalizadas en un vector para la creación del banco génico.

Una ventaja de la presente invención consiste en que los ácidos nucleicos se extraen de las muestras de suelo, se fragmentan, se cuantifican, se normalizan, y después se clonan en un vector apropiado para la clonación, amplificación y/o expresión. Como se indica aún a continuación, según la invención no es necesaria una metilación de DNA aislado para la protección ante la fragmentación indeseable mediante endonucleasas de restricción, ya que la fragmentación se efectúa antes de la normalización. Según la invención, tras la fragmentación se añaden "enganches" especiales a los fragmentos de restricción, que poseen secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción de corte extremadamente inusual. De este modo se simplifica considerablemente el procedimiento según la invención con aumento de eficacia simultáneo de la obtención del banco génico.

En este caso, otra ventaja del procedimiento según la invención es que se extraen ácidos nucleicos a partir de organismos que viven en el suelo, que no se cultivaron en el laboratorio hasta la fecha. Como ejemplos de microorganismos conocidos no cultivables hasta la fecha se deben citar: bacterias en la panza de rumiantes, endosimbiontes obligados de protozoos e insectos, la bacteria magnetotáctica *Achromatium oxaliferum* (Amann, R.I. *et al.* (1995) *Microbiol. Rev.* 59 : 143 -169).

El procedimiento según la invención se distingue en este caso porque se efectúa un aislamiento selectivo de ácidos nucleicos a partir de actinomicetes. El conocimiento exacto, o al menos la disgregación selectiva de grupos de organismos a partir de muestras de suelo es ventajoso en tanto se pueda efectuar de manera óptima la selección de un organismo huésped apropiado, en el que se deben transferir más tarde, en caso dado, los fragmentos de DNA aislados (por ejemplo con el fin de clonación o controles de funcionalidad mediante expresión).

En una variante ventajosa de la presente invención se efectúa en primer lugar un aislamiento de DNA según un protocolo modificado según la invención de Zhou *et al.* (1996, Appl. Environ. Microbiol. 62 (2) : 316 - 322), consistiendo las modificaciones en llevar a cabo los ciclos Freeze-Thaw antes del tratamiento de proteinasa K. Este tipo de preparación de muestras posibilita excluir casi un aislamiento de DNA a partir de actinomicetes. Es decir, el DNA aislado de este modo es apropiado ventajosamente para la transferencia en microorganismos Gram-negativos, como por ejemplo B.E. Coli.

Una ventaja especial del procedimiento según la invención para la obtención de un banco génico normalizado a partir de muestras de suelo es que el aislamiento de DNA se puede controlar de tal manera que el aislamiento de DNA se efectúe de manera selectiva respecto a los grupos de organismos presentes en muestras de suelo. De este modo, según la invención es posible, por ejemplo mediante un aislamiento de DNA secuencial, es decir, en primer lugar según Zhou *et al.* y a continuación según More *et al.* (1994, Appl. Environ. Microbiol., 60 (5) : 1572 -1580), aislar selectivamente DNA a partir de actinomicetes. A tal efecto se lleva a cabo en primer lugar la disgregación celular modificada según Zhou *et al.* conforme a la invención, mediante lo cual se extrae el DNA de microorganismos con excepción de actinomicetes. Tras una incubación con SDS sigue un paso de centrifugado. Las células de actinomicetes aún no disgregadas se encuentran ahora en el precipitado (comprimido). Tras un paso de lavado, el DNA se extrae de este comprimido celular con el método conforme a un protocolo modificado según la invención según More. En este caso se emplea, por ejemplo, una mezcla de perlas de gas con 0,1 - 0,25 mm de diámetro, y la purificación de DNA se efectúa por medio de sílice, en lugar de llevar a cabo una precipitación de etanol. Este modo de proceder según la invención es especialmente ventajoso si la subsiguiente clonación de DNA se debe efectuar en estreptomicetes, *Rhodococcus* o *Corynebacterium*. Por consiguiente, una ventaja del procedimiento según la invención consiste en que con el exceso y el precipitado del paso de centrifugado citado anteriormente se presentan fracciones separadas, a partir de las cuales se puede aislar DNA, que procede predominantemente de actinomicetes (precipitado), o de manera predominante no procede de actinomicetes (exceso).

En una variante ventajosa de la presente invención, los ácidos nucleicos extraídos de las muestras de suelo se separan en fragmentos de intervalo de tamaños de aproximadamente 1 - 10 kb, preferentemente de unos 2 - 9 kb, y de modo especialmente preferente de aproximadamente 3 - 8 kb. Esto se efectúa según métodos comunes, a modo de ejemplo en una carga de restricción parcial con las endonucleasas *Sau3AI* o *Hsp92II*, y su siguiente fraccionamiento por tamaños a través de electroforesis en gel.

En una variante del presente procedimiento, la fragmentación de ácidos nucleicos se efectúa bajo adición de albúmina de suero vacuno no acetilada (BSA). Según composición de las muestras de suelo empleadas para la disgregación, bajo ciertas circunstancias no se eliminan de manera suficiente las sustancias interferentes totales, entre otras sustancias húmicas, en el procedimiento de purificación a partir de la disolución de ácido nucleico. Mediante la adición de BSA no acetilada se minimiza la inhibición de endonucleasas de restricción mediante sustancias húmicas contenidas en el extracto de ácido nucleico. En este caso es ventajosa una concentración final de BSA no acetilada de aproximadamente 1 - 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , de modo preferente de aproximadamente 2 - 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y de modo especialmente preferente de aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de carga de restricción. La cantidad de BSA no acetilado a emplear se puede someter a ensayo por separado además según encima de restricción empleado (y en caso dado carga de producción), se puede desviar también de los valores citados anteriormente en el caso aislado.

El procedimiento según la invención para la obtención de un banco génico normalizado se distingue además porque la cuantificación de ácidos nucleicos extraídos de muestras de suelo y/o sus fragmentos en el paso c) se efectúa mediante colorantes fluorescentes, preferentemente por medio de SYBR-Green-I. Esto es una ventaja especial del procedimiento según la invención, ya que el extracto crudo acuoso de una muestra de suelo disgregada presenta, entre otros, un contenido elevado en sustancias húmicas, que imposibilita la cuantificación fotométrica de DNA en el extracto crudo, ya que también las sustancias húmicas absorben en gran medida en el intervalo UV, por ejemplo a 260 nm, el procedimiento según la invención soluciona este problema mediante la cuantificación de DNA con ayuda de colorantes fluorescentes, preferentemente SYBR - Green - I (Molecular Probes, Inc, USA). Generalmente, en determinaciones por medio de espectroscopía de fluorescencia se puede llegar al falseamiento de resultados debido a impurezas, por ejemplo en este caso sustancias húmicas, que conducen a una extinción de la fluorescencia. Una ventaja de la presente invención consiste en que esta extinción se puede eliminar mediante dilución del extracto crudo en un orden de magnitud de aproximadamente 1 : 30 a 1 : 50, y procedimientos de adición estándar (Skoog, D.A., Leary, J.J.: Instrumentelle Analytik- Grundlagen, Geräte. Anwendungen; páginas 176 y siguientes, 1ª edición, editorial Springer- Berlin Heidelberg New York). De este modo, el error en la determinación de DNA a partir de muestras de suelo se sitúa aún aproximadamente en un 10% según la invención.

En una variante especialmente ventajosa de la presente invención, los ácidos nucleicos fragmentados se enlazan con los denominados engarces, que presentan al menos un punto de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que se presenta con poca frecuencia. Según la invención, la unión de engarces a los ácidos nucleicos fragmentados se efectúa aún antes de la normalización de DNA, es decir, antes del paso (del procedimiento citado anteriormente). Los

engarces, y preferentemente, también el vector empleado, a modo de ejemplo, para la clonación y/o amplificación de DNA aislado, presentan una estructura génica que muestra por su parte un punto de reconocimiento para una endonucleasa de restricción I-Ppol. La endonucleasa requiere una secuencia de reconocimiento de al menos 15 pares de bases (bp) de longitud. Esto garantiza que el ácido nucleico empleado para la restricción se disocie a penas con una frecuencia extremadamente reducida, o incluso no se disocie a través del enzima. De este modo, en el genoma de la bacteria *E. coli* no se encuentra ningún punto de reconocimiento para I-Ppol, y en el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* “corta” I-Ppol únicamente tres veces. No obstante, según la invención, en principio también son concebibles otros puntos de reconocimiento presentes con poca frecuencia para endonucleasas de restricción. Es decir, alternativamente serían empleables también otras endonucleasas consecuencias de reconocimiento extremadamente largas según la invención, como por ejemplo las denominadas “endonucleasas Homing”.

Además, según la invención también es concebible que los puntos de reconocimiento de una endonucleasa de restricción en los engarces y en el vector no sean idénticos, pero al menos compatibles. Por consiguiente, también es objeto de la presente invención un procedimiento que se distingue porque en el paso f) se emplea un vector que presenta al menos un punto de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que se presenta con poca frecuencia, que es compatible con el punto de reconocimiento en los engarces. Un ejemplo de engarce preferente según la invención se muestra según SEQ ID N° 2 y 3.

Por consiguiente, también es objeto de la presente invención una estructura génica que contiene una secuencia según SEQ ID N° 9 con al menos un punto de clonación múltiple, que contiene al menos un punto de reconocimiento que se presenta con poca frecuencia para el enzima de restricción I-Ppol, así como un punto de unión de cebador y un punto de reconocimiento de polimerasa T7, que se regula en su actividad a través del operador Lac.

Además es objeto de la presente invención el empleo del punto de identificación que se presenta con poca frecuencia para la endonucleasa de restricción I-Ppol para la obtención de una estructura génica del tipo según la invención.

Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un vector que presenta al menos la estructura génica caracterizada anteriormente, así como secuencias de nucleótidos adicionales para la selección, para la replicación en la célula huésped y/o para la integración en el genoma de la célula huésped. En la literatura se describen extensamente ejemplos de vectores apropiados, como por ejemplo plásmidos de la serie Bluescript, por ejemplo pBluescript SK + (Short, J.M. *et al.* (1988) Nucleic Acids Res. 16: 7583 - 7600; Altling-Mees, M.A. and Short, J.M. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 9494), pJOE930 (Altenbuchner J. *et al.* (1982) Meth. Enzymol. 216: 457 - 466), pUC18 o 19 (Vieira, J & Messing, J, (1982) Gene 19: 259; Yanisch-Perron, C. *et al.* (1985) Gene 33 : 103).

Para la creación de un banco génico normalizado se enriquecen las especies de DNA que se presentan con poca frecuencia en la naturaleza, y correspondientemente se empobrecen las especies de DNA que se presentan frecuentemente. En principio, esto se efectúa mediante desnaturalización del dsDNA aislado a partir de las muestras de suelo, y subsiguiente renaturalización durante un cierto intervalo de tiempo, rehibridándose las especies de DNA presentes frecuentemente más rápido que las inusuales. En la normalización de DNA es crítica la estimación del momento para la conclusión de la renaturalización para conseguir una proporción óptima entre especies de DNA que se presentan con poca frecuencia y presentes frecuentemente, de modo que teóricamente se presentan todas las especies de DNA en el mismo número. Si este paso de separación de ssDNA se lleva a cabo demasiado pronto, la eficiencia de normalización es apenas reducida, ya que aún existe una gran parte de ssDNA de moléculas DNA del mismo tipo, presentes frecuentemente, de un tipo de organismo. Por otra parte si la separación de ssDNA/dsDNA se efectúa demasiado tarde, en lo posible el ssDNA total ya está hibridado de nuevo, y se presenta en doble hebra. Esto tiene por consecuencia el inconveniente agravante de no poderse aislar una cantidad suficiente de ssDNA para la elaboración subsiguiente, y en este caso además no está representada la anchura de banda total de moléculas de DNA presentes de hecho en la muestra de suelo con poca frecuencia.

Por lo tanto, una ventaja especial del procedimiento según la invención consiste en poder seguir el desarrollo temporal de renaturalización de fragmentos de ácido nucleico desnaturalizados previamente.

Según la invención, esto se efectúa mediante fluorometría con ayuda de colorantes fluorescentes específicos de DNA. En este caso, según la invención es preferente SYBR-Green-I. SYBR-Green-I ofrece la ventaja de diferenciar cualitativamente entre ssDNA y dsDNA. Esto es posible debido al diferente rendimiento de fluorescencia de ambas especies de DNA en el complejo con el colorante. El complejo [dsDNA-SYBR-Green-I] presenta una fluorescencia sensiblemente más elevada, en parte hasta 13 veces más elevada, que el correspondiente complejo colorante de ssDNA.

Según la invención, durante la rehibridación se extraen alícuotas de la “carga de normalización”, se mezclan con SYBR-Green-I, y se compara la fluorescencia con la fluorescencia de carga de control no desnaturalizada de la misma concentración de DNA. En el desarrollo de la renaturalización, la fluorescencia relativa aumenta debido al contenido creciente en dsDNA. En el caso de rehibridación completa de ssDNA a dsDNA se alcanza el valor de fluorescencia original de las muestras no desnaturalizadas. En el modo de proceder descrito anteriormente es problemática la toma de muestras, o bien la reducción presente de condiciones de hibridación y la composición del tampón de rehibridación. Esto se soluciona de modo ventajoso mediante la presente invención, siendo suficiente un volumen de muestra muy reducido, de aproximadamente 1-5  $\mu$ l, preferentemente 1,5-3  $\mu$ l, de modo especialmente preferente 1,8 - 2,5, y de

modo especialmente preferente 2  $\mu$ l como máximo para la espectroscopía de fluorescencia. Además, las puntas de pipeta se calientan previamente a una temperatura que corresponde a la temperatura de hibridación para prevenir una toma de muestras inexacta y un descenso de la temperatura de hibridación. En una variante según la invención se emplea un tampón de hibridación, que contiene como máximo un 0,01%, preferentemente de un 0,0001 a un 0,01%, de modo especialmente preferente de un 0,0001 a un 0,001% de SDS (v/v), y una concentración de cloruro sódico entre 0,1 M y 1,5 M, preferentemente de 0,2 M a 1,0 M, de modo especialmente preferente de 0,3 M a 0,8 M, y en especial de 0,4 M.

Por consiguiente, en una variante de la presente invención, por medio del modo de proceder expuesto, a modo de ejemplo respecto a una concentración empleada de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de DNA (3-6 kb) de fraccionamiento mayor a partir de la bacteria *E. coli*, se puede determinar un momento óptimo para la interrupción de la hibridación en el intervalo de aproximadamente 70 - 220 minutos, de modo preferente de aproximadamente 80 - 200 minutos, y de modo especialmente preferente de aproximadamente 100 - 140 minutos.

Una vez concluida la desnaturalización y su siguiente renaturalización (rehibridación), el DNA (ssDNA) presente aún como hebra simple se separa del DNA (dsDNA) renaturalizado de hebra doble, y se amplifica, a modo de ejemplo, por medio de PCR. La repetición múltiple de los pasos de normalización descritos anteriormente según la invención conduce al enriquecimiento deseado de especies de DNA presentes con poca frecuencia a partir de muestras de suelo, con empobrecimiento simultáneo de especies de DNA presentes frecuentemente, de modo que se obtienen fracciones de especies de ácido nucleico en la que todas las especies de DNA se presentan aproximadamente con la misma frecuencia (normalizadas).

Para la separación de ssDNA de dsDNA se dispone de diversas posibilidades en principio, como por ejemplo cromatografía de adsorción (por ejemplo por medio de gel de sílice o hidroxiapatita), o una fragmentación de dsDNA por medio de endonucleasas de restricción. Según la invención es preferente un procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de muestras de suelo, efectuándose la cromatografía de adsorción por medio de hidroxiapatita (fosfato de calcio cristalino  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$ ). En una variante ventajosa del procedimiento según la invención para la obtención de un banco génico normalizado a partir de muestras de suelo, la cromatografía de adsorción no se efectúa como es habitual en forma de una columna, sino en carga discontinua. En otra variante de la presente invención, la cromatografía de adsorción se efectúa en columnas (Spin) (por ejemplo columnas Mobicol vacías de la firma MoBiTec. Göttingen), que se cargan con suspensión de hidroxiapatita.

En la separación de ssDNA en carga discontinua, esto se efectúa según la invención mediante adición de 10 a 100  $\mu$ l de suspensión de hidroxiapatita, preferentemente 25 - 80  $\mu$ l, y de modo especialmente preferente 40 - 60  $\mu$ l por 1  $\mu$ g de DNA. Las condiciones concebibles en las que se puede efectuar la separación en procedimiento discontinuo son, por ejemplo, recipientes de reacción PCR (0,2 ml) o recipientes de reacción estándar (1,5, o bien, 2 ml). Para conseguir que sólo se una el dsDNA a la hidroxiapatita, y el ssDNA quede en el exceso, según la invención se absorbe la carga de DNA total (carga de rehibridación) a temperatura ambiente en tampón de elución ssDNA (tampón salino medio, por ejemplo 0,15 - 0,17 M  $\text{NaPO}_4$ : pH 6,8), y se añade a la hidroxiapatita igualmente suspendida en tampón de elución de ssDNA. La separación de ssDNA y dsDNA se efectúa según la invención a temperaturas de 20°C a 60°C, preferentemente de 20°C a 30°C, y de modo especialmente preferente de 22°C (RT). Para una separación de ssDNA a RT se absorbe la carga de DNA a RT en tampón de elución ssDNA 0,17 M  $\text{NaPO}_4$  (pH 6,8). Para una separación a 60°C, esta se absorbe en tampón de elución 0,15 M ssDNA. La elución de dsDNA enlazado se efectúa con 0,34 M  $\text{NaPO}_4$  (pH 6,8) (tampón de elución de dsDNA). Tras adición de tampón y centrifugado breve, el DNA deseado en cada caso se encuentra en el exceso. En una variante de este procedimiento, la separación se efectúa sobre columnas Spin a temperatura ambiente. En este caso, la carga de rehibridación absorbida en tampón de elución de ssDNA se introduce en columnas Spin, que están cargadas con 50 - 100  $\mu$ l de suspensión de hidroxiapatita (suspendida en tampón de elución de ssDNA). Tras el centrifugado, el ssDNA en el eluato; el dsDNA enlazado se puede eluir igualmente mediante centrifugado tras adición de tampón de elución de dsDNA.

El modo de proceder en la carga discontinua explicado anteriormente según la invención se distingue en este caso, frente a la cromatografía en columna convencional, por la ventaja de que es posible la elaboración de un mayor número de muestras, la separación es temperable de manera constante y sencilla, y además se efectúa más rápidamente. Por lo demás, el manejo es en suma más sencillo que los procedimientos descritos en los libros de texto, como por ejemplo de Maniatis (Maniatis V., Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis V (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol I-III. Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Como se ha expuesto anteriormente, el ssDNA deseado, que se presenta con poca frecuencia, se presenta en el exceso, o bien eluato tras centrifugado de la carga de hidroxiapatita, y en caso dado se puede emplear, tras una purificación a través de procedimientos comunes de cromatografía en gel (por ejemplo Sephadex) o extracción con butanol, para la elaboración subsiguiente, como por ejemplo PCR, o la clonación en un vector apropiado, resultando en un banco génico normalizado de ácidos nucleicos de microorganismos que viven en el suelo.

Además es objeto de la presente invención el empleo del banco génico normalizado, obtenido según la invención, para la identificación de genes que codifican para nuevos biocatalizadores de microorganismos que viven en el suelo. Para el especialista son conocidos modos de proceder correspondientes para la exploración de un banco génico para la identificación de nuevos biocatalizadores.

A modo de ejemplo, a tal efecto se transfiere un banco génico normalizado del tipo descrito anteriormente en un organismo huésped apropiado, como bacterias, y en este caso, por ejemplo *Escherichia coli*, *Salmonella spec.*, *Streptomyces Spec.*, *Streptomyces inidulans*, *Streptomyces lividans*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus* o *Corynebacterium* o levaduras, como por ejemplo *Pichia* o *Saccharomyces*. La enumeración de organismos huéspedes es ejemplar en este caso, y no es limitante para la presente invención. Los microorganismos transformados obtenidos, para la selección de nuevos biocatalizadores, se cultivan a continuación sobre un medio nutriente (por ejemplo placas de agar LB), a la que se añadieron sustratos concebibles de una clase de enzimas interesante, como por ejemplo esterases, lipasas, oxigenasas, etc. Como medios nutrientes se pueden emplear también medios selectivos, a los que se añaden, por ejemplo, sustancias tóxicas. Mediante el crecimiento de microorganismos transformados, la formación de una corona de lisis, la turbidez del medio de cultivo, una reacción cromática u otras reacciones concebibles, se pueden seleccionar entonces aquellos productos transformados que contienen con probabilidad elevada un nuevo biocatalizador de microorganismos de muestras del suelo no cultivables en laboratorio hasta la fecha. A partir de los productos transformados seleccionados se puede (re)aislar, secuenciar y caracterizar adicionalmente el DNA normalizado, resultando en la disponibilidad de genes correspondientemente nuevos que codifican para nuevos biocatalizadores con sector de aplicación interesante desde el punto de vista económico.

También es concebible una identificación de genes que codifican para nuevos biocatalizadores a través de experimentos de hibridación de banco génico normalizado con sondas de DNA o RNA apropiadas o anticuerpos.

La presente invención se explica más detalladamente por medio de los siguientes ejemplos, que, no obstante, no son limitantes para la presente invención.

## Ejemplos

### 1. General

Procedimientos técnicos génicos, o bien genéticos moleculares generales, como por ejemplo cargas de restricción, clonaciones, cultivo y selección de organismos transgénicos, electroforesis en gel de agarosa, obtención de cebadores, PCR etc., se efectuaron conforme a métodos comunes según Maniatis *et al.* (Maniatis V., Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis V (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol I-III. Cold Spring Harbour Laboratory Press).

### 2. Aislamiento de DNA

a) *Aislamiento de DNA modificado según Zhou et al. (1996, Appl. Environ. Microbiol., 62 (2): 316 - 322 para la clonación en E. coli*

Con ayuda de este método se puede aislar DNA a partir de muestras de suelo con rendimiento elevado, pero apenas se disgregaron actinomicetes.

#### Tampón

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM, pH8

Na-EDTA, 100 mM, pH 8

Fosfato sódico 100 mM, pH 8

NaCl 1,5 M

1% de CTAB (bromuro de hexadecil-metilamonio).

Se mezcla 1 g de muestra de suelo con 2,6 ml de tampón de extracción, y se somete a 3 ciclos "freeze-thaw" (nitrógeno líquido -> + 65°C). Después se añaden 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml), y bajo agitación se incuba 30 min a 37°C. A continuación se añaden 300 µl de disolución de SDS al 20%, y se incuba 2 horas a 65°C. Después se centrifuga la carga 10 min a 5000 rpm y se recoge el exceso. El comprimido se lava una vez con 2 ml de tampón de extracción y 250 µl de SDS al 20% (10 minutos de incubación a 65°C, centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos). Los excesos reunidos se mezclan con 1/10 volúmenes de CTAB al 10%, se mezclan y se centrifugan 10 min a 5000 rpm. La fase acuosa se extrae con un volumen de cloroformo. Después se precipita la fase acuosa con 0,7 volúmenes de isopropanol. El comprimido se absorbe en 100 µl de TE.

b) *Aislamiento de DNA modificado según More (1994, Appl. Environ. Microbiol. 60 (5): 1572 - 1580) con purificación directa*

Con este método se puede aislar DNA de todos los microorganismos, incluyendo los actinomicetes con rendimiento elevado.

## ES 2 299 631 T3

### *Tampón*

Tampón fosfato sódico: 100 mM, pH 8

5 Tampón 10% SDS: NaCl 100 mM  
Tris-HCl 500 mM, pH 8  
10% (w/v) SDS

10 Tampón L6: Tiocianato de guanidina 5 M  
Tris-HCl 50 mM, pH 8  
15 NaCl 25 mM  
EDTA 20 mM  
1,3% de Triton X-100

20 Tampón L2: Tiocianato de guanidina 5 M  
Tris-HCl 50 mM, pH 8  
NaCl 25 mM

25 Sílice: Se suspenden 4,8 g de sílice en 40 ml de H<sub>2</sub>O, se deja sedimentar 24 horas.  
Se extraen 35 ml de exceso, se completa con H<sub>2</sub>O a 40 ml, se deja sedimentar 30 minutos.  
30 Se extrae el exceso, se completa a 40 ml, se deja sedimentar.  
Se extraen 36 ml, se añaden al “comprimido” 48 µl de HCl al 30%.  
35 Se extraen alícuotas, se almacenan en la oscuridad a RT.

Se mezclan 0,5 g de muestra de suelo con 0,5 ml de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8, 250 µl de tampón SDS y 2 g de perlas de vidrio (Ø 0,1 mm - 0,25 mm), y se mezcla. Después se trata la carga 10 minutos en el molino de Retsch con una frecuencia de vibración de 1800 min<sup>-1</sup> y una amplitud de 80, y a continuación se centrifuga 10 minutos a temperatura ambiente a 14000 rpm. Se extrae el exceso, el comprimido se incubaba con 300 µl de tampón fosfato sódico, pH 8, y 2 minutos en baño ultrasónico, y a continuación se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm. Los excesos reunidos se mezclan con 2/5 Volúmenes de acetato de NH<sub>4</sub> 7,5 M, y se incubaba 5 minutos sobre hielo. A continuación se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm, y se mezcla el exceso (650 µl) con 1/10 volúmenes de sílice (65 µl) y 2 volúmenes de tampón L6 (1,3 ml), y se centrifuga 3 minutos a 3000 rpm. El exceso se vierte, se añaden 1,3 ml de tampón L2, y se mezcla convenientemente mediante agitación. Después se centrifuga 3 minutos a 3000 rpm. Se desecha el exceso, y se lava el comprimido con 1,5 ml de etanol al 70% (agitación, centrifugado de 3 minutos a 3000 rpm), y se seca. Para la elución de DNA se añaden 100 ml de TE, se incuban 10 minutos a 56°C bajo agitación, y se centrifuga 1 minutos a 14000 rpm, se extrae el exceso cuidadosamente, y se traslada a un recipiente de Eppendorf fresco.

50

### 3. Purificación de DNA

A tal efecto se emplean los siguientes materiales:

55

Columnas de cromatografía de exclusión: columna CHROMA SPIN<sup>TM</sup> - 1000, CLONTECH Laboratories, Inc.; tampón de elución: Tris/HCl 10 mM, pH 8,5. Antes de añadir el DNA de suelo aislado a la columna CHROMA SPIN<sup>TM</sup> - 1000, se lava la columna con el tampón de elución (Tris/HCl 10 mM, [pH 8,5]), según datos del fabricante. Hasta 100 µl de DNA de suelo aislado se añaden a la columna CHROMA SPIN<sup>TM</sup> - 1000, y se eluyen según datos del fabricante. El grado de purificación se puede estimar registrándose espectros UV/VIS antes y después del paso de purificación. Un descenso de absorción a través del intervalo UV/VIS total indica una reducción de la concentración de sustancias húmicas en la disolución de muestra (la banda de absorción de ácidos nucleicos se sitúa entre aproximadamente 230 y 300 nm).

65



## ES 2 299 631 T3

### 4. Cuantificación de DNA mediante colorantes fluorescentes

Se emplearon los siguientes materiales:

- Tampón TE: tris/HCl 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM [pH 8,0]
- SYBR Green I: Sigma, disolución de trabajo: 1:3750 (diluida con TE)
- DNA de timo de cordero: Sigma, disolución madre y patrones elaborados con tampón TE.
- Disolución madre: 100 µg/ml
- Patrones: 0,0 µg/ml; 0,3 µg/ml; 0,7 µg/ml; 1,0 µg/ml; 2,0 µg/ml; 3,0 µg/ml; 4,0 µg/ml; 5,0 µg/ml
- Fluorímetro: Longitud de onda de excitación: 485 nm de longitud de onda de emisión: 535 nm (óptima: 524 nm).

#### *Ensayo previo*

En primer lugar se diluye el extracto crudo disgregado (por ejemplo 1:50, en último término dependiendo del contenido en dsDNA en la muestra de suelo y en el procedimiento de disgregación), en tal medida que la absorción se sitúa en 535 nm y  $485 \text{ nm} \leq 0,05$  por una parte, pero simultáneamente aún está presente suficiente dsDNA en la muestra diluida para garantizar una medida exacta. A tal efecto se lleva a cabo un ensayo previo en el que se determinan las fluorescencias de diferentes etapas de dilución del extracto crudo. Estos valores de fluorescencia se deben situar naturalmente dentro de la recta de calibrado empleada, y ascender al menos al quintuple-séxtuple de fluorescencia del valor de recta de calibrado obtenido mediante ensayo en blanco.

*Adición de patrón: (adición del patrón de DNA a alícuotas de muestra diluida).*

- 50 µl de muestra diluida (véase 1).
- + 50 µl de patrón de DNA (0,0 - 5 µg/ml; DNA de timo de cordero)
- + 50 µl de SYBR Green I (1:3750 con TE, pH 7,5).

*Recta de calibrado:*

- 50 µl de TE.
- + 50 µl de patrón de DNA (0,3 - 5 µg/ml; DNA de timo de cordero)
- + 150 µl de SYBR Green I (1:3750 con TE, pH 7,5).

*Dotación del extracto crudo con DNA de timo de cordero para la determinación del nuevo hallazgo:*

Se dota una alícuota de extracto crudo con una disolución de DNA de concentración conocida. Ejemplo: 300 µl de extracto crudo disgregado con 5 µl de DNA de timo de cordero (100 µg/ml). Esta alícuota dotada se diluye del mismo modo que la muestra en 2, y según el procedimiento de adición de patrón se determina la concentración de dsDNA (véase 2 (en lugar de “muestra diluida”, ahora se emplea “muestra dotada”)).

*Condiciones de reacción/parámetros de medida:*

- Tiempo de reacción: 10 minutos (en la oscuridad).
- Temperatura: temperatura ambiente.
- Longitud de onda de excitación: 485 nm
- Longitud de onda de emisión: 535 nm
- Placas de microtitración estándar (óptimas con ondas negras).

*Valoración (ejemplar):*

- En el ensayo previo se consideró suficiente una dilución del extracto crudo de 1:30 ( $Abs(535\text{ nm}) = 0,008$ ;  $Abs(485\text{ nm}) = 0,021$ ).

- Cálculo del factor de corrección dependiente K:

a) a partir del dato citado anteriormente “recta de calibrado” se calcula la pendiente de la recta de calibrado  $m(\text{calib})$

b) a partir del dato citado anteriormente “adición de patrón” se calcula la pendiente de la recta de calibrado  $m$  (muestra), o bien  $m(\text{muestra dotada})$

c) factor de corrección dependiente  $K = m(\text{calib})/m(\text{muestra})$  (o bien,  $m(\text{muestra dotada})$ )

d) ahora se multiplican los valores de fluorescencia  $F$  de la adición de patrón de muestra, o bien de muestra dotada por el factor de corrección de pendiente  $K \Rightarrow F_{\text{corr}*}$

e) con los valores de fluorescencia corregidos  $F_{\text{corr}*}$  se determina la concentración de dsDNA en la muestra, o bien en la muestra dotada, según el método de valoración habitual para procedimientos de adición de patrón.

En la tabla 1 y en la figura 2 se representa un ejemplo de valoración de un extracto crudo de suelo.

## 5. Fragmentación de DNA

La fragmentación de DNA se efectúa según práctica de laboratorio común. En este caso se digiere en particular el DNA con *Hsp92II* (Promega) bajo adición de  $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de BSA no acetilado (exento de DNA, de Sigma) a  $37^\circ\text{C}$ . La reacción se detiene mediante adición de 1/10 volúmenes de EDTA (0,5 M, pH 8,0). Los tiempos de reacción requeridos exactamente, las cantidades de enzima y BSA para una digestión limitada, dependen en gran medida de las cargas de DNA, y por lo tanto se deben determinar a propósito en ensayos previos. El especialista está familiarizado con los correspondientes métodos. El DNA digerido se precipita con isopropanol, se absorbe en  $\text{H}_2\text{O}$ , y se separa a través de un gel de agarosa al 0,8%. El intervalo de tamaños 3 - 5 kb se purifica del gel con ayuda de columnas QIAquick (Qiagen).

El efecto positivo de BSA no acetilado respecto a las endonucleasas de restricción se sometió a ensayo mediante investigaciones microscópicas de diferencia y con ayuda de ensayos de banda. En este caso se pudo mostrar que se llega a una interacción entre el BSA no acetilado y los ácidos húmicos (se emplean ácidos húmicos comerciales (Fluka)) (figura 11). La adición de BSA no acetilado a la carga de reacción posibilita la digestión de DNA genómico en presencia de concentraciones más elevadas de sustancias húmicas en comparación con la puesta en práctica de la reacción sin adición de BSA. En el caso de la endonucleasa de restricción *Sau3AI*, la concentración de ácidos húmicos puede ser aproximadamente 350 más veces más elevada si se añade a la reacción BSA no acetilado (concentración de inhibición mínima [MIC] de ácido húmico sin adición de BSA: aproximadamente  $0,2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ , MIC de ácido húmico con adición de BSA: aproximadamente  $70\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ; a modo de ejemplo en ácidos húmicos comerciales (firma Fluka, Lot 45729/1)) (figura 12). Sin embargo, las endonucleasas de restricción reaccionan con diferente sensibilidad respecto a las sustancias húmicas, y por consiguiente tienen también diferente MIC. Para el enzima *Hsp 92II* se determinó una MIC de sustancias húmicas sin adición de BSA de aproximadamente  $0,2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mediante adición de BSA no acetilado aumentó la MIC a aproximadamente  $3,0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  de sustancias húmicas (factor: 15). Del mismo modo se debe determinar la concentración óptima de BSA para cada enzima de restricción. En el caso de *Sau3AI*, esta se sitúa en  $8\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de disolución de reacción (final), para *Hsp 92II* se determinó una concentración óptima de BSA de  $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de carga de reacción. Un aumento adicional de la concentración de BSA no tenía ningún efecto positivo sobre la MIC. Para ahorrar pasos de optimizado, generalmente se recomienda una concentración final de BSA de  $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ : tras la adición de BSA no acetilado a la carga de reacción (aún no se añade enzima) hubo que cumplir un tiempo de incubación previo de 5 minutos. Mediante este paso se garantizará que el BSA no acetilado tenga suficiente tiempo para reaccionar completamente con la sustancias húmicas.

## 6. Unión con engarces apropiados para la clonación y amplificación

En la figura 3 según SEQ ID N° 1 y 2 se representan engarces apropiados. La unión de engarces con el DNA fragmentado de bacterias del suelo se efectúa según datos del fabricante (LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega).

## ES 2 299 631 T3

### 7. Normalización de DNA

A tal efecto se emplearon los siguientes materiales:

- 5        - Tampón TE: Tris/HCl 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM [pH 8,0]
- SYBR Green I: Sigma, disolución de trabajo: 1:4000 diluida con tampón TE
- Disolución de NaCl 3 M
- 10       - Disoluciones de urea: 1 M; 2 M
- DNA fragmentado (3-10 kbp, digestión parcial): 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (en el recipiente de reacción)
- 15       - Recipiente de reacción de 200  $\mu\text{l}$
- Se calientan previamente las puntas de pipetas a 65°C
- Fluorímetro: longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de emisión: 535 nm (óptima: 524 nm).
- 20       - Thermocycler con tapa calentable.

25       La muestra a normalizar (30  $\mu\text{l}$  de volumen; 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA (3-10 kbp), NaCl 0,4 M) se calienta en primer lugar a 65°C. A continuación se extrajo una alícuota de 2  $\mu\text{l}$  y se trasladó a 18  $\mu\text{l}$  de disolución de urea 1 M. Esta disolución se almacena inmediatamente sobre hielo ( $= N_{\text{dsDNA}}$ ). La desnaturalización de la muestra se efectúa a 95°C durante 5 minutos. Tras el enfriamiento de la muestra a la temperatura de rehibridación (65°C) se extrae de nuevo una alícuota de 2  $\mu\text{l}$ , se traslada a 18  $\mu\text{l}$  de disolución de urea 1 M ( $= N_0$ ), y se almacena inmediatamente sobre hielo. En el desarrollo del tiempo de rehibridación total se extraen otras alícuotas en diferentes momentos. La medida de fluorescencia se efectúa como se describe a continuación:

- 30       20  $\mu\text{l}$  de muestra ( $N_{\text{dsDNA}}$ ,  $N_0$ ,  $N_{1h}$ , ...)
- + 100  $\mu\text{l}$  de disolución de urea 2 M
- 35       + 80  $\mu\text{l}$  de SYBR Green I (1: 4000 en TE)

se elaboran en placas de microtitración estándar (óptimas con ondas negras), y se incuban 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente; longitud de onda de excitación: 485 nm; longitud de onda de emisión: 535 nm. La valoración se efectuó mediante aplicación de la fluorescencia relativa frente al tiempo de renaturalización. El resultado representa como diagrama de barras en las figuras 4, 5 y 6.

### 8. Separación de ssDNA a través de hidroxipatita

- 45       a) Separación de ssDNA a temperatura ambiente en procedimiento discontinuo, productos químicos y aparatos
- Hidroxipatita: Bio-Gel HTP hidroxipatita, o bien DNA Grade Bio-Gel HTP Hidroxypatite (Biorad)
  - Tampón de elución ssDNA:  $\text{NaPO}_4$  0,17 M [pH 6,8]
  - 50       - Tampón de elución dsDNA:  $\text{NaPO}_4$  0,34 M [pH 6,8].

#### Puesta en práctica

55       Tras la normalización se enfría la disolución DNA 5 minutos a temperatura ambiente. Si pH y concentración de fosfato del tampón de rehibridación no corresponden a las condiciones del tampón de elución de ssDNA, la disolución de DNA se ajusta a condiciones de tampón de elución de ssDNA ( $\text{NaPO}_4$  0,17 M [pH 6,8]) mediante adición de tampón  $\text{NaPO}_4$  altamente concentrado. Para el enlace en la hidroxipatita se añaden a la disolución de DNA, por ejemplo, 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión de hidroxipatita (en tampón de elución ssDNA), se mezclan previamente (Vortex), se incuban 1 minutos a RT, se mezclan de nuevo, se incuban 1 min a RT. Tras centrifugado subsiguiente (2-5 seg, RT), se extrae el exceso, y este contiene la mayor parte de ssDNA. Para la elución de ssDNA restante se añaden 30  $\mu\text{l}$  de tampón de elución ssDNA, se mezclan, se centrifugan 2-5 segundos y se extrae el exceso. Este procedimiento se repite al menos 5 veces.

65

## b) Separación de ssDNA a temperatura ambiente con hidroxapatita como columna de Spin

*Productos químicos y aparatos*

- Como en 8a)

- columnas Mobicoi vacías con filtros reducidos (diámetro 2,7 mm, 35  $\mu$ M de tamaño de poro) de la firma MoBiTec (Göttingen).

*Puesta en práctica*

La desnaturalización, renaturalización, el enfriamiento a RT, así como el ajuste a condiciones de tampón de elución de ssDNA se efectúan como se indica en (8a).

Para la obtención de la columna de Spin de hidroxapatita se pipetea y se centrifuga brevemente 50  $\mu$ l de una suspensión de hidroxapatita (en tampón de elución ssDNA) en la columna Mobicol. La disolución de DNA se aplica sobre la columna de Spin de hidroxapatita, y se mezclan cuidadosamente DNA e hidroxapatita. Tras centrifugado breve a RT, el eluato contiene la mayor parte de ssDNA. El ssDNA se puede obtener mediante elución con 150  $\mu$ l de tampón de elución de ssDNA.

## 9. Amplificación de ssDNA para la clonación en estructuras génicas apropiadas o vectores

La amplificación de ssDNA se efectúa con el sistema Expand Long Template PCR de Roche según datos del fabricante. Como cebador sirve el oligonucleótido, también utilizado en el engarce, Link1. La separación de productos de PCR inespecíficos y del cebador no requerido durante la PCR se efectúa a través de un gel de agarosa (0,8% de agarosa). El intervalo de tamaños 3-5 kb se eluye con ayuda de columnas QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de PCR se digieren con *I-Ppol*, y se purifican a través de columnas QIAquick (Qiagen). El eluato se linealiza para la unión con la estructura génica previamente tratada de modo correspondiente pSCR, que se linealizó con *I-Ppol*, (Promega), y se defosforiló con CIAP (Promega). A continuación se transforma *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con la estructura.

## 10. Obtención de la estructura génica pSCR

Para la obtención del plásmido pSCR se dirigió el plásmido pBR322 con HindIII (NEB) y MvaI269I (Fermentas), y se aisló un fragmento de 3033 bp de longitud. En este vector se ligó en primer lugar el Stuffer stuff 1, o bien stuff 2 según SEQ ID N° 3 y 4. El plásmido resultante se cortó con NotI, y se ligaron las regiones de promotor T71, o bien T72 (del plásmido pET-15b, Promega), lo que resultó en dos promotores T7 enfrentados. En el punto de corte intermedio BamHI se ligaron entonces los oligonucleótidos para los puntos de clonación múltiples MCS1, o bien MCS2, según SEQ ID N° 5 y 6, que presentan un punto de corte 1-PpoI. Los correspondientes cortes de secuencia y la secuencia total de la estructura génica pSCR se representan las figuras 7-9, o bien en la figura 10.

## 11. Rastreo del banco génico normalizado para la identificación de genes que codifican para nuevos biocatalizadores de muestras de suelo

Tras la transformación se efectúa el rastreo, a modo de ejemplo en esterazas, plaqueándose células recién transformadas directamente sobre placas de tributirina (turbias) (1,5% de agar, 1% (w/v) de tributirina, medio LB; homogeneizado antes de tratamiento en autoclave). Tras incubación durante 24 horas a 37°C se almacenan las placas turbias a 4°C, y se investigan cada día para la verificación de la formación de una corona (de lisis). Los clones alrededor de los que se ha formado una corona de lisis se identifican como potencialmente positivos para esteraza. Estos clones se trasladan a la placa de medio selectivo en medio completo, se cultivan, y se someten a otros análisis.

**Legendas respecto a las tablas y figuras**

Tabla 1: Ejemplo de la valoración de cuantificado fluorimétrico de dsDNA a partir de muestras de suelo disgregadas sin purificación previa.

Figura 1: Separación mediante electroforesis en gel de DNA aislado a partir de bacterias del suelo. Traza 1: marcador de tamaños (kb), traza 2: *Arthrobacter*-More, traza 3: *Pseudomonas*-More, traza 4: *Rhodococcus*-More, traza 5: *Arthrobacter*-Zhou, traza 6: *Pseudomonas*-Zhou, traza 7: *Rhodococcus*-Zhou.

Figura 2: Representación gráfica del procedimiento de corrección para la cuantificación fluorimétrica de dsDNA en muestras de suelos disgregadas.

Figura 3: Secuencias de nucleótidos según SEQ ID N° 1 y 2 correspondientes a los cebadores empleados preferentemente link 1 para la obtención de una estructura génica preferente.

Figura 4: Representación de la rehibridación de DNA de *E. coli* mediante la aplicación de fluorescencia relativa en relación con el tiempo de rehibridación.

Figura 5: Representación de la rehibridación de DNA de *Pseudomonas*, así como una mezcla de DNA de *Pseudomonas* y *E. coli* en proporción 2:1 mediante la aplicación de fluorescencia relativa en relación con el tiempo de rehibridación.

Figura 6: Representación de la rehibridación de DNA de muestras de suelo mediante la aplicación de fluorescencia relativa en relación con el tiempo de rehibridación.

Figura 7: Secuencias de nucleótidos según SEQ ID N° 3 y 4 correspondientemente a los stuffer empleados preferentemente stuffer1 y stuffer2 para la obtención de una estructura génica preferente.

Figura 8: Secuencias de nucleótidos según SEQ ID N° 5 y 6 correspondientemente a los puntos de clonación múltiples empleados preferentemente MCS1 y MCS2 para la obtención de una estructura génica preferente.

Figura 9: Secuencias de nucleótidos según SEQ ID N° 7 y 8 correspondientemente a los promotores T7 empleados preferentemente T7-1 y T7-2 para la obtención de una estructura génica preferente.

Figura 10: Secuencias de nucleótidos según SEQ ID N° 9 de una estructura génica preferente pSCR que contiene secuencias de stuffer stuffer 1 y stuffer 2, dos secuencias de promotor opuestas del promotor T7, a partir del plásmido pET 15b de Promega, que se regula mediante el operador lac, así como múltiples puntos de clonación que contienen al menos la secuencia de reconocimiento, presente con poca frecuencia, para la endonucleasa de restricción I-Ppol de *Physarum polycephalum*.

Figura 11: Concentración inhibidora mínima (MIC) de ácidos húmicos (Fluka) para el enzima de restricción Sau3AI sin (a), o bien con (b) adición de BSA no acetilado. Se digirieron 1 µg de DNA de *E. coli* genómico con Sau3AI (0,3 µg, absoluto) en presencia de concentraciones crecientes de ácidos húmicos.

a) Traza M: marcador de tamaños; traza K: sin Sau3AI; traza 1-7: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 µg/ml de ácidos húmicos.

b) Traza M: marcador de tamaños; traza K: sin Sau3AI; traza 1-10: 0; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 150; 200; 500 µg/ml de ácidos húmicos.

Sin la presencia de BSA (a) no acetilado se digirió aún el DNA en presencia de 0,2 µg/ml de ácidos húmicos. A concentraciones de ácido húmico más elevadas se inhibió en gran medida el enzima. En el caso de adición de 10 µg/µl (final) de BSA no acetilado a la carga de reacción se digirió completamente el DNA genómico aún en presencia de 70 µg/ml de ácidos húmicos.

Figura 12: Ensayo en banda para la identificación de la interacción de ácidos húmicos (Fluka) y BSA no acetilado. Se incuban 20 µg de ácidos húmicos con contenidos crecientes en BSA no acetilado, y se analiza mediante electroforesis (gel de agarosa al 1,0%). En presencia de BSA no acetilado se presenta una banda adicional, que no se puede identificar en la banda de control (0 µg de BSA).

# REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo,
  - a) extrayéndose ácidos nucleicos de seres vivos contenidos en muestras de suelo,
  - b) efectuándose una fragmentación de ácidos nucleicos,
  - c) efectuándose una cuantificación de fragmentos de ácido nucleico por medio de colorantes fluorescentes,
  - d) efectuándose una normalización de fragmentos de ácido nucleico, desnaturalizándose en primer lugar los fragmentos de ácido nucleico, y siguiéndose el desarrollo de la renaturalización por medio de colorantes fluorescentes,
  - e) efectuándose una separación de ácidos nucleicos presentes en doble hebra de los ácidos nucleicos presentes en hebra simple mediante cromatografía de absorción una vez concluida la renaturalización, presentándose las especies de ácido nucleico contenidas en la fracción de ácidos nucleicos de hebra simple aproximadamente con la misma frecuencia (normalizada),
  - f) clonándose las especies de ácido nucleico normalizadas en un vector para la creación del banco génico.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se efectúa un aislamiento selectivo de ácidos nucleicos a partir de actinomicetes.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque en la fragmentación de ácidos nucleicos se emplea albúmina de suero vacuno en concentraciones de aproximadamente 1-15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , de modo preferente de aproximadamente 2-12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y de modo especialmente preferente de aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de carga de restricción.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los ácidos nucleicos fragmentados se enlazan con engarces, que presentan al menos un punto de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que se presenta con poca frecuencia.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se emplean los engarces que presentan un punto de reconocimiento para el enzima de restricción I-Ppol.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque en el paso f) se emplea un vector que presenta al menos un punto de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que se presenta con poca frecuencia, que es compatible con el punto de reconocimiento en los engarces.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la cuantificación de ácidos nucleicos extraídos de muestras de suelo y/o sus fragmentos en el paso c) se efectúa mediante colorantes fluorescentes, preferentemente mediante SYBR-Green-I.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el desarrollo temporal de la renaturalización de fragmentos de ácidos nucleicos previamente desnaturalizados en el paso d) se sigue mediante fluorimetría con colorantes fluorescentes específicos para DNA, preferentemente con SYBR-Green-I.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque la cromatografía de adsorción en el paso e) se efectúa por medio de hidroxipatita.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la cromatografía de adsorción en el paso e) se efectúa en carga discontinua.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la separación de ssDNA y dsDNA se lleva a cabo a 20 hasta 60°C, preferentemente a 20 hasta 30°C, y de modo especialmente preferente a 22°C.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque la separación de ssDNA y dsDNA se lleva a cabo en un tampón  $\text{NaPO}_4$  con una concentración de 0,15 - 0,17 M.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la cromatografía de adsorción en el paso e) se efectúa en columnas de Spin.
14. Estructura génica que contiene una secuencia según SEQ ID N° 9 con al menos un punto de clonación múltiple que contiene al menos un punto de reconocimiento que se presenta con poca frecuencia para el enzima de restricción

## ES 2 299 631 T3

I-Ppol, así como un punto de enlace de cebador y un punto de reconocimiento de polimerasa T7, que se regula en su actividad a través del operador Lac.

15. Vector que contiene al menos una estructura génica según la reivindicación 14.

16. Empleo del punto de reconocimiento que se presenta con poca frecuencia para la endonucleasa de restricción I-Ppol para la obtención de una estructura génica según la reivindicación 14, o un vector según la reivindicación 15.

17. Empleo del banco génico normalizado obtenido conforme a un procedimiento según una de las reivindicaciones 1-13 para la selección de genes que codifican para biocatalizadores de microorganismos que viven en el suelo.

Tabla 1:

| DNA de timo de<br>cordero [ $\mu\text{g/ml}$ ] | Recta de calibrado<br>Fluorescencia relativa<br>[] | Extracto crudo de<br>suelo, 1 : 30<br>Fluorescencia relativa<br>[] | Extracto crudo de<br>suelo, 1: 30,<br>Fluorescencia relativa<br>corregida [] |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 0,1                                            | 293                                                | 8740                                                               | 10725                                                                        |
| 0,3                                            | 1412                                               | 9805                                                               | 12031                                                                        |
| 0,7                                            | 4634                                               | 12544                                                              | 15391                                                                        |
| 1                                              | 7202                                               | 14648                                                              | 17973                                                                        |
| 2                                              | 15645                                              | 21728                                                              | 26660                                                                        |
| 3                                              | 24208                                              | 28612                                                              | 35108                                                                        |
| 4                                              | 32215                                              | 34697                                                              | 42574                                                                        |
|                                                |                                                    |                                                                    |                                                                              |
| <u>Pendiente</u>                               | 8308,9                                             | 6771,7                                                             | 8308,9                                                                       |
| <u>Factor de corrección de<br/>pendiente K</u> |                                                    | 1,2270                                                             |                                                                              |

Figura 1:

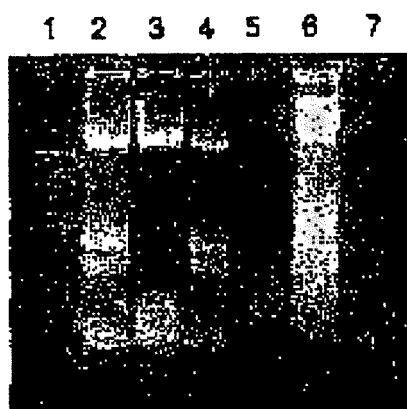
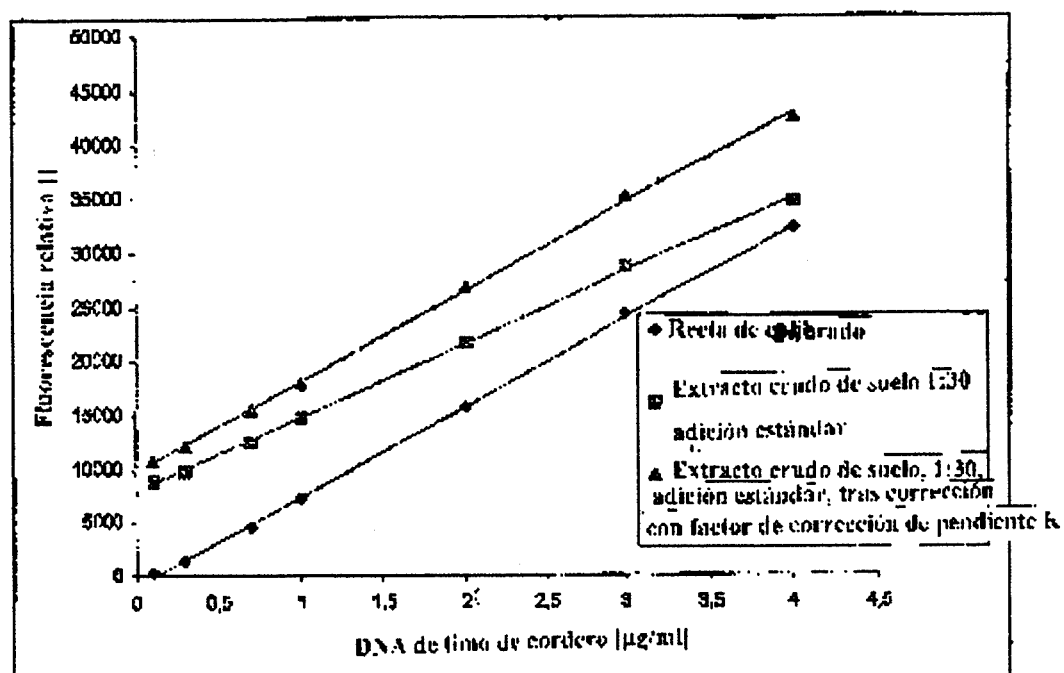




Figura 2



**Figura 3:**

**Engarce 1: 5'-GGTCATGAACTCTCTTAAGGTAGCATG-3'**

**Engarce 2: 3'-TCCAGTACTTGAGAGAATTCCATC-5'**

**Figura 4:**

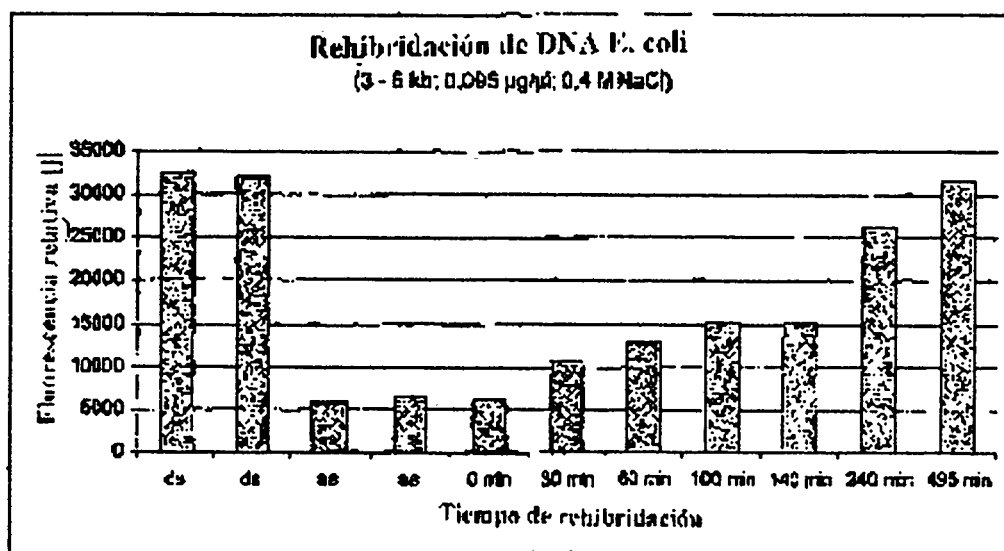


Figura 5:

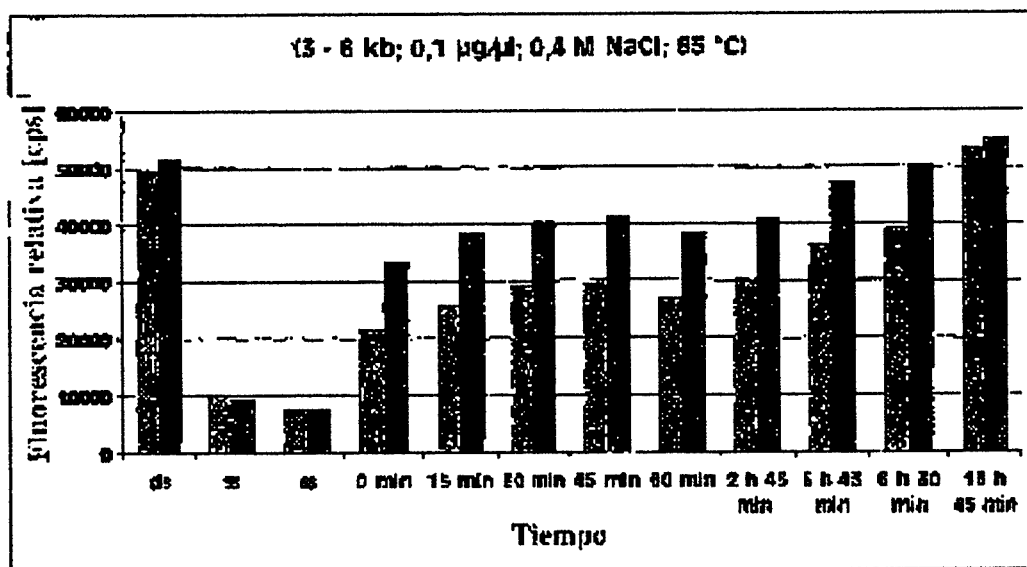
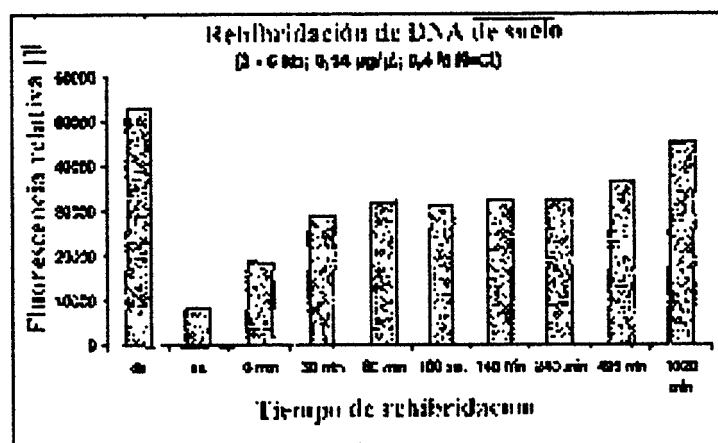


Figura 6:



**Figura 7:**

**Stuff 1: 5'-AGCTTTAATGCGGCCGCTGTGAATGCG-3'**

**Stuff 2: 3'-AATTACGCCGCGGACACTTAC-5'**

**Figura 8:**

**MCS1: 5'-GATCCCGGGCATGCTCTCTTAAGGTAGCG-3'**

**MCS2: 3'-GGCCCGTACGAGAGAATTCCATCGCCTAG-5'**

**Figura 9:**

**T7-1:**

**5'-GGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCG-3'**

**T7-2:**

**3'-CGATTATGCTGAGTGATATCCCCTTAACACTCGCCTATTGTTAAGGCCTAG-5'**

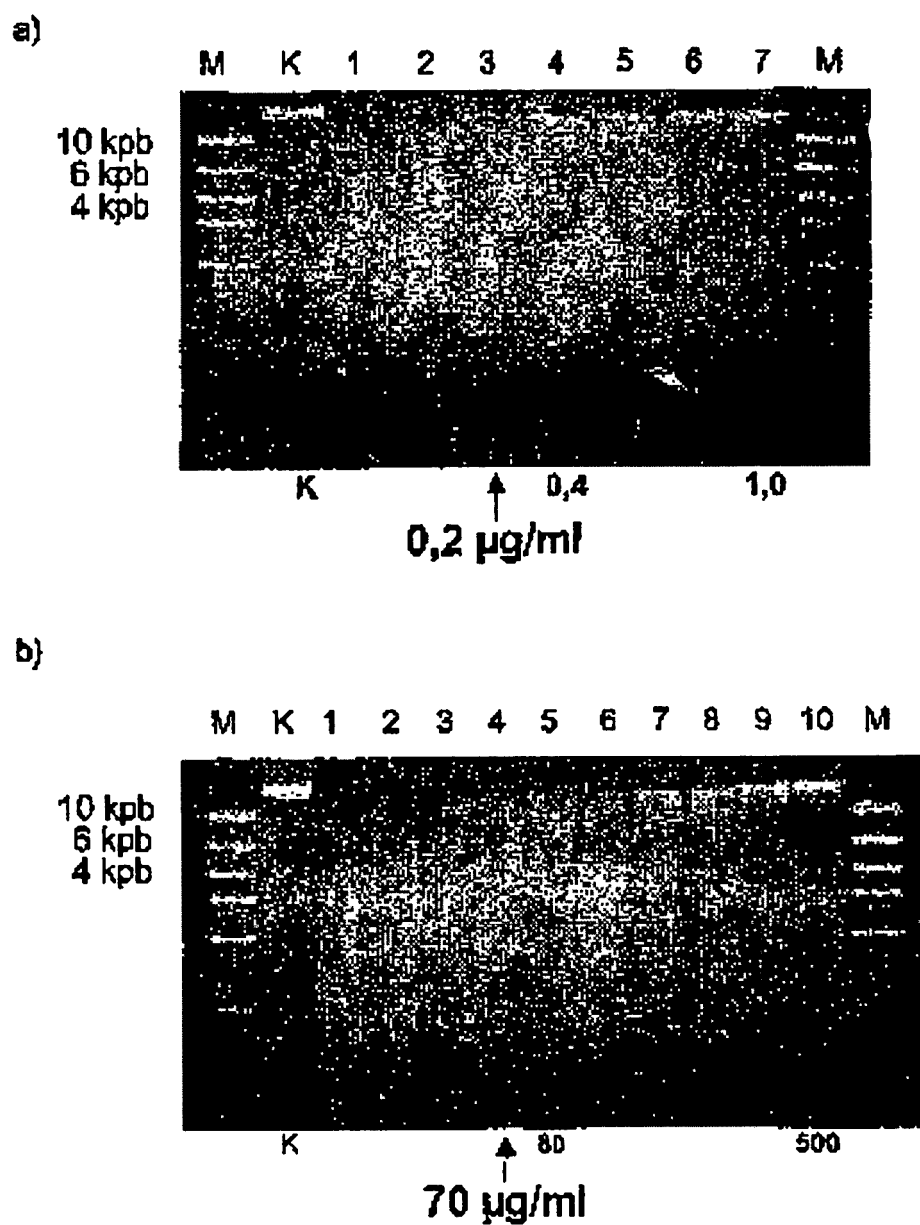
**Figura 10:**

**pSCR:**

**5-**

**ATAAGCTTTAATGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATA  
ACAATTCCGGATCCCGGGCATGCTCTCTTAAGGTAGCGGATCCGGAATTGTTATCC  
GCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCGGCCGCTGTGAATGCGCAAA-3'.**

Figura 11:



**Figura 12:**



# ES 2 299 631 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

|    |                                                                                                                                               |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <110> BASF Aktiengesellschaft                                                                                                                 |    |
| 5  | <120> Procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo y su empleo |    |
|    | <130> 1                                                                                                                                       |    |
| 10 | <140> n                                                                                                                                       |    |
|    | <141> 2001-09-12                                                                                                                              |    |
|    | <160> 7                                                                                                                                       |    |
| 15 | <170> PatentIn Ver. 2.1                                                                                                                       |    |
|    | <210> 1                                                                                                                                       |    |
| 20 | <211> 27                                                                                                                                      |    |
|    | <212> DNA                                                                                                                                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                                                                                                    |    |
| 25 | <220>                                                                                                                                         |    |
|    | <223> Descripción de secuencia artificial: Stuffer sentido 5'-3'.                                                                             |    |
|    | <400> 1                                                                                                                                       |    |
| 30 | agctttaatg cggccgctgt gaatgcg                                                                                                                 | 27 |
|    | <210> 2                                                                                                                                       |    |
|    | <211> 21                                                                                                                                      |    |
| 35 | <212> DNA                                                                                                                                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                                                                                                    |    |
|    | <220>                                                                                                                                         |    |
| 40 | <223> Descripción de secuencia artificial: Stuffer sentido 3'-5'.                                                                             |    |
|    | <400> 2                                                                                                                                       |    |
| 45 | aattagccg gcgacctta c                                                                                                                         | 21 |
|    | <210> 3                                                                                                                                       |    |
|    | <211> 29                                                                                                                                      |    |
| 50 | <212> DNA                                                                                                                                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                                                                                                    |    |
|    | <220>                                                                                                                                         |    |
| 55 | <223> Descripción de secuencia artificial: Punto de clonación múltiple sentido 5'-3'.                                                         |    |
|    | <400> 3                                                                                                                                       |    |
| 60 | gatcccgggc atgctctctt aaggtagcg                                                                                                               | 29 |
|    | <210> 4                                                                                                                                       |    |
| 65 | <211> 29                                                                                                                                      |    |
|    | <212> DNA                                                                                                                                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                                                                                                    |    |



## ES 2 299 631 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Punto de clonación múltiple sentido 3'-5'.

5 <400> 4

ggcccgtagc agagaattcc atgcctag

29

10 <210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Promotor T7 sentido 5'-3'.

20 <400> 5

ggccgctaatac gactcact ataggggaat tggagcggga taacaattcc g

51

25 <210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Promotor T7 sentido 3'-5'.

35 <400> 6

cgattatgct gattgatatc ccctaacac tgcctattg ttaaggccta g

51

40 <210> 7

<211> 165

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Estructura génica pSCR

50 <400> 7

ataagcttta atcgggccgc taatagcact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 60

ttccggatcc cgggcatgct ctcttaaggt agcggatccg gaattgttat ccgctcaca 120

55

ttccctata gtgagtcgta ttagcgccgc ctgtgaatgc gcaaa 165

### 60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF Aktiengesellschaft

65 <120> Procedimiento para la obtención de un banco génico normalizado a partir de extractos de ácido nucleico de muestras de suelo y su empleo

<130> PCT/EP 02/10510

# ES 2 299 631 T3

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
|    | <160> 9                       |    |
|    | <170> PatentIn Ver. 3.1       |    |
| 5  | <210> 1                       |    |
|    | <211> 27                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
| 10 | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> Engarce, 5'-3'          |    |
| 15 | <400> 1                       |    |
|    | ggtcacgaac tctcttaagg tagcatg | 27 |
| 20 | <210> 2                       |    |
|    | <211> 24                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> Engarce, 3'-5'          |    |
| 30 | <400> 2                       |    |
|    | tccagtactt gagagaattc catc    | 24 |
| 35 | <210> 3                       |    |
|    | <211> 27                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
| 40 | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> Stuffer, 5'-3'          |    |
| 45 | <400> 3                       |    |
|    | agctttaatg cggccgctgt gaatgcg | 27 |
| 50 | <210> 4                       |    |
|    | <211> 21                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
| 55 | <213> Secuencia artificial    |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> Stuffer, 3'-5'          |    |
| 60 | <400> 4                       |    |
|    | aattacgccg gcgacactta c       | 21 |
| 65 | <210> 5                       |    |
|    | <211> 29                      |    |

## ES 2 299 631 T3

|    |                                                         |    |
|----|---------------------------------------------------------|----|
|    | <212> DNA                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                              |    |
| 5  | <220>                                                   |    |
|    | <223> Punto de clonación múltiple 5'-3'                 |    |
|    | <400> 5                                                 |    |
| 10 | gatcccgggc atgctctctt aaggtagcg                         | 29 |
|    | <210> 6                                                 |    |
| 15 | <211> 29                                                |    |
|    | <212> DNA                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                              |    |
| 20 | <220>                                                   |    |
|    | <223> Punto de clonación múltiple 3'-5'                 |    |
|    | <400> 6                                                 |    |
| 25 | ggcccgtacg agagaattcc atgcctag                          | 29 |
|    | <210> 7                                                 |    |
| 30 | <211> 51                                                |    |
|    | <212> DNA                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                              |    |
| 35 | <220>                                                   |    |
|    | <223> Promotor T7 5'-3'                                 |    |
|    | <400> 7                                                 |    |
| 40 | ggccgctaatac gactcact ataggggaat tggagcggg taacaattcc g | 51 |
|    | <210> 8                                                 |    |
| 45 | <211> 51                                                |    |
|    | <212> DNA                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                              |    |
| 50 | <220>                                                   |    |
|    | <223> Promotor T7 3'-5'                                 |    |
|    | <400> 8                                                 |    |
| 55 | cgattatgct gagtgatc ccctaacac tgcctattg ttaaggccta g    | 51 |
|    | <210> 9                                                 |    |
| 60 | <211> 165                                               |    |
|    | <212> DNA                                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial                              |    |
| 65 | <220>                                                   |    |
|    | <223> Estructura génica pSCR                            |    |

## ES 2 299 631 T3

<400> 9

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | ataagcttta atcgggccgc taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa | 60  |
|    | ttccggatcc cgggcatgct ctcttaaggt agcggatccg gaattgttat ccgctcacia | 120 |
|    | ttcccctata gtgagtcgta ttagcggccg ctgtgaatgc gcaaa                 | 165 |
| 10 |                                                                   |     |
| 15 |                                                                   |     |
| 20 |                                                                   |     |
| 25 |                                                                   |     |
| 30 |                                                                   |     |
| 35 |                                                                   |     |
| 40 |                                                                   |     |
| 45 |                                                                   |     |
| 50 |                                                                   |     |
| 55 |                                                                   |     |
| 60 |                                                                   |     |
| 65 |                                                                   |     |