



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 277 346**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96925351 .7**

(86) Fecha de presentación : **17.07.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0839185**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.1998**

(54) Título: **Métodos de cribado de enzimas y kits enzimáticos.**

(30) Prioridad: **18.07.1995 US 503606**
07.12.1995 US 568994
03.06.1996 US 657409

(73) Titular/es: **DIVERSA CORPORATION**
4955 Directors Place
San Diego, California 92121, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

(72) Inventor/es: **Short, Jay, M.;**
Marrs, Barry y
Stein, Jeffrey, L.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Métodos de cribado de enzimas y kits enzimáticos.

5 El presente invento hace referencia al campo de la preparación y el cribado de genotecas de clones que contienen ADN de origen microbiano y a genotecas de proteínas, por ejemplo, de enzimas. En concreto, el presente invento está dirigido a genotecas de expresión de enzimas recombinantes y genotecas de enzimas recombinantes en las que las enzimas recombinantes se generan a partir de ADN obtenido de microorganismos.

10 El sector ha reconocido la necesidad de encontrar nuevas enzimas para una amplia gama de aplicaciones industriales. En consecuencia, se han cribado diversos microorganismos con el objetivo de determinar si poseen una actividad enzimática específica demandada. En aquellos casos en los que un microorganismo presenta una actividad enzimática deseada, se aísla la enzima del microorganismo.

15 Las colonias de microorganismos formadas de forma natural a menudo abarcan una desconcertante diversidad metabólica y fisiológica. De hecho, se ha calculado que, hasta la fecha, no se ha llegado a cultivar ni el 1% de los microorganismos existentes en el mundo. Se ha sugerido que todavía no ha sido posible identificar una gran parte de esta diversidad debido a las dificultades que conllevan el enriquecimiento y el aislamiento de microorganismos en cultivo puro. Por consiguiente, ha resultado difícil o imposible identificar o aislar enzimas valiosas de estas muestras. Tales 20 limitaciones indican la necesidad de utilizar enfoques alternativos para la caracterización del potencial metabólico y fisiológico, esto es, las actividades de interés de los microorganismos todavía no cultivados, que hasta ahora sólo se han caracterizado mediante análisis de fragmentos de genes con ARNr amplificado por PCR, aislados por clonación a partir de ácidos nucleicos de colonias mixtas.

25 McCormick (*Methods of Enzymology*, páginas 445-449, 1987) y Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Vol. 2, Cold Spring Harbor, Nueva York, páginas 8.50-8.51, 1989) describen un método denominado *sib selection* o selección de hermanos. La finalidad de dicho método consiste en abordar el problema del aislamiento de genes de una genoteca de secuencias de ADN. La selección de hermanos es un método de fraccionamiento secuencial de una muestra heterogénea que puede aplicarse al aislamiento de una secuencia, gen o familia genética de 30 una genoteca completa. Las porciones de la genoteca que ofrecen resultados positivos para una actividad concreta se subfraccionan nuevamente hasta obtener un único clon positivo.

35 De conformidad con un aspecto del invento, en el presente documento se proporciona un nuevo enfoque para la obtención de enzimas para usos adicionales. Con arreglo al presente invento, se generan enzimas recombinantes a partir de microorganismos y se clasifican según diversas características enzimáticas.

Asimismo, en el presente documento también se describe una genoteca de expresión recombinante formada por 40 múltiples clones capaces de expresar enzimas recombinantes. La genoteca de expresión se obtiene al aislar el ADN de un microorganismo, clonar dicho ADN en un vector de expresión adecuado que se utiliza a continuación para transfectar o transformar un huésped apropiado que expresará una proteína recombinante.

Por lo tanto, existe la posibilidad, por ejemplo, de aislar ADN genómico de un microorganismo cultivable o no cultivable y utilizar dicho ADN para producir una genoteca de expresión recombinante adecuada que posibilite la determinación posterior de la actividad enzimática.

45 Esta genoteca de expresión recombinante se puede preparar sin necesidad de cribar previamente el microorganismo a partir del cual se preparará la genoteca para determinar la actividad enzimática.

Una vez que se han preparado múltiples clones de expresión recombinante a partir de ADN aislado de un microorganismo, se criban los polipéptidos expresados por dichos clones en busca de su actividad enzimática y las 50 características enzimáticas especificadas, con el objetivo de identificar y clasificar los clones recombinantes que producen polipéptidos con las características enzimáticas especificadas.

Asimismo, en el presente documento también se describe un proceso de cribado de clones cuyo ADN procede 55 de un microorganismo sin cultivar que tiene como objetivo localizar la actividad de una proteína determinada, por ejemplo, una enzima. En este proceso se incluye: El cribado en busca de una actividad específica de una proteína, por ejemplo, una enzima, en una genoteca de clones preparada mediante: (i) el aislamiento del ADN de una población de ADN originaria de, como mínimo, un microorganismo sin cultivar; (ii) la transformación de un huésped con ADN aislado para producir un genoteca de clones que se criban para obtener una actividad específica de una proteína, por 60 ejemplo, una enzima.

La genoteca se genera a partir de ADN aislado sin cultivar un organismo, especialmente en los casos en los que el ADN se extrae de una muestra ambiental que contiene microorganismos que no se pueden cultivar.

65 Preferentemente, el ADN se liga en un vector, en especial cuando el vector está integrado además por secuencias reguladoras de la expresión que pueden controlar y regular la producción de una actividad enzimática detectable a partir del ADN ligado.

ES 2 277 346 T3

El factor F (o factor de fertilidad) de *E. coli* es un plásmido que provoca una alta frecuencia de transferencia propia durante la conjugación y, con menos frecuencia, la transferencia del propio cromosoma bacteriano. Para obtener y propagar de manera estable fragmentos grandes de ADN procedentes de muestras microbianas mixtas, una forma de realización preferente consiste en utilizar un vector de clonación que contenga un factor F como origen de la replicación para crear genotecas genómicas que se puedan replicar con gran fidelidad. La integración con ADN procedente de muestras ambientales mixtas sin cultivar posibilita la obtención de fragmentos genómicos de grandes dimensiones en forma de “genoteca de ADN ambiental” estable.

Preferentemente, el ADN bicatenario obtenido a partir de la población de ADN sin cultivar se selecciona:

En primer lugar, convirtiendo el ADN genómico bicatenario en ADN monocatenario.

En segundo lugar, aislando del ADN monocatenario convertido el citado ADN monocatenario que se une específicamente, por ejemplo, mediante hibridación, a una secuencia de ADN sonda.

Finalmente, convirtiendo el ADN monocatenario aislado en ADN bicatenario.

La sonda se puede unir directa o indirectamente a una fase sólida por la que se separa del ADN monocatenario que no está hibridado o unido específicamente de otro modo a la sonda.

El proceso también puede incluir la separación del ADN monocatenario de dicha sonda tras haber aislado el ADN monocatenario hibridado o unido por otros medios a la sonda y la amplificación de este ADN monocatenario separado antes de su conversión en ADN bicatenario.

En el presente documento se describe también un procedimiento para el cribado de clones cuyo ADN procede de un microorganismo sin cultivado con el objetivo de localizar una actividad específica de una proteína, por ejemplo, enzima. Para ello, se realiza un cribado para localizar la actividad específica del producto de una proteína de un complejo génico de la genoteca de clones preparada: (i) aislando el ADN de una población de ADN derivada de, como mínimo, un microorganismo sin cultivar; y (ii) transformando un huésped con ADN aislado para producir un genoteca de clones que se criban para localizar una actividad específica de una proteína, por ejemplo, una enzima. La genoteca se genera a partir del ADN de un complejo génico que se aísla sin cultivar un organismo, en especial en aquellos casos en los que los complejos génicos de los que procede el ADN se aíslan de una muestra ambiental que contiene microorganismos que no se pueden cultivar.

Como alternativa, se selecciona ADN bicatenario procedente de un complejo génico que se ha obtenido a partir de una población de ADN sin cultivar. Para ello, se convierte el ADN bicatenario del complejo génico en ADN monocatenario; del ADN policistrónico monocatenario del complejo génico se aísla el ADN monocatenario que se une específicamente, por ejemplo, mediante hibridación, a una secuencia sonda polinucleótida; y, finalmente, se convierte el ADN monocatenario aislado en ADN bicatenario.

Éstos y otros aspectos del presente invento se describen en sus formas de realización preferentes, aspectos que resultarán evidentes a los expertos en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se muestra una visión general de los procedimientos utilizados para la creación de una genoteca ambiental a partir de una muestra mixta de picoplancton, tal y como se describe en el ejemplo 3;

En la figura 2 se muestra una representación esquemática de una forma de realización con diversos niveles de características químicas de una enzima que se podrían utilizar en el presente invento, tal y como se describe en el ejemplo 4;

En la figura 3 se muestra una representación esquemática de otra forma de realización con diversos niveles de características químicas de una enzima que se podrían utilizar en el presente invento, tal y como se describe en el ejemplo 4;

En la figura 4 se muestra una representación esquemática de otra forma de realización con diversos niveles de características químicas de una enzima que se podrían utilizar en el presente invento, tal y como se describe en el ejemplo 4;

En la figura 5 se muestra una representación esquemática de otra forma de realización con diversos niveles de características químicas de una enzima que se podrían utilizar en el presente invento, tal y como se describe en el ejemplo 4;

En la figura 6 se muestran los resultados de óptimos de pH proporcionados por la enzima ESL-001-01 en los experimentos descritos en el ejemplo 5;

ES 2 277 346 T3

En la figura 7 se muestran los resultados de óptimos de temperatura proporcionados por la enzima ESL-001-01 en los experimentos descritos en el ejemplo 5;

5 En la figura 8 se muestran los resultados de tolerancia a disolventes orgánicos proporcionados por la enzima ESL-001-01 en los experimentos descritos en el ejemplo 5;

Descripción detallada de las formas de realización preferentes

10 De acuerdo con un aspecto preferente del presente invento, las enzimas recombinantes se distinguen por unas características tanto físicas como químicas. Estas características químicas se clasifican preferentemente por niveles, de forma que las enzimas recombinantes con características químicas comunes se vuelven a clasificar en función de otras características químicas que podrían ser o no más selectivas o específicas, y así de forma sucesiva, como se explica con mayor detalle a continuación.

15 Como se ha indicado anteriormente, las enzimas recombinantes también se clasifican preferentemente por sus características físicas, y uno o varios niveles de las enzimas clasificadas por sus características químicas se podrían clasificar también en función de sus características físicas o viceversa.

20 En el presente documento, el término “característica química” de una enzima recombinante hace referencia a la función química o sustrato sobre el que actúa la enzima, a la reacción catalítica que ejecuta la enzima o a ambas. Por ejemplo, una reacción catalítica podría ser la hidrólisis (hidrolasas), y una función química podría ser el tipo de enlace sobre el que actúa la enzima (las esterasas escinden los enlaces éster) o el tipo concreto de estructura sobre el que actúa la enzima (una glucosidasa que actúa sobre los enlaces glucosídicos). Así pues, y a modo de ejemplo, una enzima recombinante que actúa sobre enlaces glucosídicos podría, por ejemplo, clasificarse químicamente según el sistema por niveles de la forma siguiente: nivel 1: hidrolasa; nivel 2: enlaces acetales; nivel 3: glucosidasa.

25 En el presente documento, una “característica física” de una enzima recombinante hace referencia a una propiedad (que no sea una reacción química) como pH, estabilidad térmica, temperatura óptima para la reacción catalítica, tolerancia a disolventes orgánicos, selectividad frente a iones metálicos, sensibilidad a detergentes, etc.

30 En una forma de realización del invento, en la que se adopta un enfoque por niveles para la clasificación de las enzimas recombinantes en función de sus características químicas, físicas o de ambos tipos, las enzimas clasificadas en uno o varios niveles de características químicas también se podrían clasificar en función de una o varias características físicas y viceversa. En una forma de realización preferente, las enzimas se clasifican por sus características tanto físicas como químicas, por ejemplo, en función de los sustratos individuales sobre los que actúan así como en función de sus características físicas.

35 Así pues, como ejemplo representativo de la manera en la que se podría clasificar una enzima recombinante con arreglo al presente invento, una enzima recombinante es una proteasa (en esta ilustración, el nivel 1 es hidrolasa; el nivel 2 es amida (enlace peptídico)) que se podría clasificar adicionalmente en el nivel 3 como el último punto de la secuencia de aminoácidos en el que se produce la escisión; por ejemplo, anión, catión, hidrofóbica pequeña, hidrofóbica grande. Todas las enzimas recombinantes clasificadas por su cadena lateral en el nivel 3 se pueden clasificar también en función de características físicas del tipo indicado anteriormente.

40 45 De esta manera, de la genoteca recombinante se pueden seleccionar enzimas que comparten determinadas características químicas, como por ejemplo todas las endopeptidasas (que actúan sobre los enlaces peptídicos internos), y que comparten una característica física específica, como por ejemplo todas las que actúan de forma óptima sobre un pH comprendido en un intervalo concreto.

50 Como se ha indicado anteriormente, una genoteca de enzimas recombinantes preparada a partir de un microorganismo se clasifica preferentemente por sus características químicas de acuerdo con un enfoque por niveles. Para ello, podrían someterse inicialmente a prueba los polipéptidos recombinantes generados por la genoteca con un cribado de baja selectividad, por ejemplo, la reacción catalítica ejecutada por la enzima. Para realizar con éxito este procedimiento, podría realizarse el cribado para localizar una o varias de las seis clases de enzimas determinadas por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB, en sus siglas en inglés), a saber, oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

55 60 A continuación, se puede realizar un cribado de las enzimas recombinantes que han ofrecido resultados positivos para una o varias clases de la IUB con la finalidad de localizar una actividad enzimática más específica.

65 Así pues, y a modo de ejemplo, si se criba la genoteca recombinante en busca de actividad hidrolásica, se podría realizar un cribado adicional de los clones recombinantes que ofrecieran resultados positivos para dicha actividad con el objetivo de localizar una actividad hidrolásica más específica, como el tipo de enlace sobre el que actúa la hidrolasa. Por lo tanto, puede realizarse, por ejemplo, un nuevo cribado de las enzimas recombinantes que son hidrolasas para determinar cuáles actúan sobre una o varias funciones químicas específicas, como: (a) amida (enlaces peptídicos), esto es, proteasas; (b) enlaces éster, esto es, esterasas y lipasas; (c) acetales, esto es, glucosidasas, etc.

ES 2 277 346 T3

Las enzimas recombinantes clasificadas en función del enlace químico sobre el que actúan se pueden cribar nuevamente para determinar una actividad más especializada, como el tipo de sustrato sobre el que actúan.

Así pues, por ejemplo, las enzimas recombinantes que se han clasificado como enzimas que actúan sobre los enlaces éster (lipasas y esterasas) se pueden cribar nuevamente para determinar su capacidad de generar compuestos ópticamente activos, esto es, la capacidad de actuar sobre sustratos específicos, como alcoholes meso, diácidos meso, alcoholes quirales, ácidos quirales, etc.

Por ejemplo, las enzimas recombinantes que se han clasificado como enzimas que actúan sobre los acetales se pueden cribar nuevamente para clasificarlas en función de un tipo específico de sustrato sobre el que actúan, por ejemplo, (a) azúcares P1 como glucosa, galactosa, etc., (b) polímeros de glucosa (de tipo exo, endo o ambos), etc.

Niveles enzimáticos

Así, los siguientes niveles constituyen ejemplos representativos, aunque en ningún caso restrictivos, de niveles enzimáticos:

Nivel 1

Las divisiones se basan en la reacción catalítica ejecutada por la enzima, como hidrólisis, reducción, oxidación, etc. Se utilizarán las seis clases de la IUB: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Nivel 2

Las divisiones se basan en la función química objeto de la reacción, por ejemplo, ésteres, amidas, diésteres de fosfato, monoésteres de sulfuro, aldehídos, cetonas, alcoholes, acetales, cetales, alcanos, olefinas, anillos aromáticos, anillos heteroaromáticos, oxígeno molecular, enoles, etc.

Tanto las lipasas como las esterasas escinden los enlaces éster. La diferencia radica en si el sustrato natural se agrega al interior de la membrana (lipasas) o bien se dispersa en una solución (esterasas).

Nivel 3

Las divisiones y subdivisiones se basan en las diferencias entre las estructuras de los sustratos individuales que presentan un enlace covalente con la función objeto de la reacción, tal y como se define en el nivel 2. Un ejemplo es la hidrólisis del acetal: ¿forma el acetal parte de la glucosa o galactosa, o bien es el acetal el anómero α o el anómero β ? Estos son los tipos de distinciones que se establecen en el Nivel 3. Las divisiones basadas en la especificidad del sustrato son únicas para cada reacción enzimática concreta, y se obtendrán diferentes distinciones del sustrato si la enzima es, por ejemplo, una proteasa o una fosfatasa.

Nivel 4

Las divisiones se basan en cuál de los dos posibles productos enantioméricos produce la enzima. Se trata de una medida de la capacidad de la enzima para reaccionar de forma selectiva con uno de los dos enantiómeros (resolución cinética) o de la capacidad de la enzima para reaccionar con un compuesto mesodisfuncional para generar de manera selectiva uno de los dos productos enantioméricos de la reacción.

Nivel 5

Nivel Ortogonal/Nivel de Características Físicas

El nivel 5 es ortogonal con respecto a los otros niveles. Se basa en las propiedades *físicas* de las enzimas y no en las reacciones químicas *per se*. El nivel 5 establece una segunda dimensión con la que clasificar las enzimas. El nivel 5 se puede aplicar a cualquier otro nivel, pero se aplica con mayor frecuencia al nivel 3.

Así pues, de acuerdo con un aspecto del presente invento, una genoteca de expresión se produce de manera aleatoria a partir del ADN de un microorganismo, en particular, el ADN genómico o ADNc del microorganismo, y las proteínas recombinantes o polipéptidos producidos por dicha genoteca de expresión se criban para clasificar las enzimas recombinantes en función de diversas características enzimáticas. En una forma de realización preferente, las proteínas recombinantes se criban en busca de una o más características químicas concretas, y se vuelven a cribar las enzimas identificadas como poseedoras de dichas características para localizar una característica química todavía más específica. Este cribado se puede repetir una o más veces. Además, en una forma de realización preferente, también se criban las enzimas recombinantes para clasificarlas según una o varias características físicas. De este modo, las enzimas recombinantes generadas a partir del ADN de un microorganismo se clasifican en función de características tanto químicas como físicas, con lo que es posible seleccionar enzimas recombinantes procedentes de uno o más organismos diferentes que comparten una o varias características químicas y/o una o varias características físicas. Es más, dado que tales enzimas son recombinantes, existe la posibilidad de producir tales enzimas en la cantidad y el grado de pureza que se deseé.

ES 2 277 346 T3

El enfoque por niveles del presente invento no cuenta con las limitaciones de otros enfoques por niveles en los que, por ejemplo, los niveles son más restrictivos. Por ejemplo, el enfoque por niveles también se puede aplicar con una estructura en la que el primer nivel sea el de enzimas ligninolíticas y, en consecuencia, el segundo nivel podría ser el tipo de enzima que es una enzima ligninolítica.

5

De igual manera, el primer nivel o cualquier otro nivel podría referirse a las características físicas y el siguiente nivel podría recoger las características químicas específicas.

Así, el presente invento se puede aplicar de manera general a la obtención de enzimas recombinantes y de genotecas 10 de enzimas recombinantes en las que diversas enzimas se clasifican en función de sus distintas características químicas, físicas o de ambos tipos.

Los microorganismos a partir de los cuales se pueden preparar las genotecas recombinantes incluyen microorganismos procarióticos, como las eubacterias y las arqueobacterias, y microorganismos eucarióticos inferiores, como 15 hongos, algunas algas y protozoos. Los microorganismos pueden ser cultivados o no cultivados obtenidos de muestras ambientales, y pueden ser extremófilos, como termófilos, hipertermófilos, psicrófilos, psicrótrofos, etc.

Preferentemente, la genoteca se genera a partir de ADN aislado sin cultivar un organismo, especialmente cuando 20 el ADN se aísla de una muestra ambiental que contiene microorganismos que no se pueden cultivar. Se favorece que las fuentes del ADN de microorganismos que se utiliza como genoteca inicial de material de la que se obtendrá el ADN incluyan muestras ambientales, por ejemplo, muestras microbianas recogidas de hielo ártico y antártico, fuentes de agua o permafrost, materiales de origen volcánico, materiales procedentes de tierra o especies vegetales de zonas tropicales, etc. Así, por ejemplo, se podría aislar ADN genómico de organismos no cultivados o no cultivables y emplear dicho ADN para crear una genoteca adecuada de clones que permita la determinación posterior de la actividad 25 enzimática.

Las bacterias y muchos eucariotas disponen de un mecanismo coordinado que regula los genes cuyos productos están implicados en procesos relacionados. Los genes se agrupan en estructuras denominadas "complejos génicos" en 30 un único cromosoma y se transcriben de forma conjunta controlados por una única secuencia reguladora, que contiene un único promotor que inicia la transcripción de todo el complejo. El complejo genético, el promotor y las secuencias adicionales que actúan de forma conjunta en la regulación se denominan "operón" y pueden incluir hasta 20 genes o más, aunque generalmente presentan entre 2 y 6 genes. Así pues, un complejo genético es un grupo de genes adyacentes que son idénticos o están relacionados, normalmente en sus funciones.

35 Algunas familias genéticas están compuestas por miembros idénticos. La agrupación en complejos es un requisito previo para conservar la identidad entre genes, aunque los genes que componen un complejo no tienen por qué ser idénticos. Los complejos génicos pueden abarcar muy diversas opciones, desde los casos en los que la duplicación se genera para los genes adyacentes relacionados hasta los casos en los que cientos de genes idénticos se organizan en tandem. En ocasiones, no se puede extraer un significado claro de la repetición de un gen concreto. Un excelente 40 ejemplo de esta situación es la expresión duplicada del gen de la insulina en algunas especies, mientras que en otras especies de mamíferos un único gen de la insulina es suficiente.

Resulta de gran importancia proseguir con la investigación de los complejos génicos y determinar hasta qué punto 45 la longitud total de un complejo es necesaria para la expresión de las proteínas que de él se derivan. Además, los complejos génicos experimentan reorganizaciones continuas, por lo que sería útil poder crear genotecas heterogéneas de complejos génicos a partir de, por ejemplo, bacterias u otras fuentes procarióticas con el objetivo de determinar fuentes de nuevas proteínas, especialmente aquellas proteínas, por ejemplo, enzimas, como las poliquetido sintetasas 50 responsables de la síntesis de poliquetidos, cuyas actividades útiles son muy variadas. También se incluyen otros tipos de proteínas producto de complejos génicos, como los antibióticos, antivirales, agentes antitumorales y proteínas reguladoras, como la insulina.

Los poliquetidos son unas moléculas que constituyen una fuente extremadamente rica de bioactividades, incluidos 55 los antibióticos (como las tetraciclinas y la eritromicina), agentes anticancerígenos (daunomicina), inmunosupresores (FK506 y rapamicina) y productos veterinarios (monensina). Muchos poliquetidos, producidos por las poliquetido sintetasas, son valiosos agentes terapéuticos. Las poliquetido sintetasas son enzimas multifuncionales que catalizan la biosíntesis de una gran variedad de cadenas de carbono con diferentes longitudes y patrones funcionales y de ciclización. Los genes de la poliquetido sintasa se agrupan en complejos génicos, y como mínimo un tipo (denominado tipo I) de poliquetido sintasa cuenta con enzimas y genes de tamaño grande, hecho que dificulta la manipulación genética y los estudios *in vitro* de estos genes o proteínas.

60

La posibilidad de poder seleccionar y combinar determinados componentes de una genoteca de poliquetidos y genes biosintéticos derivados de poliquetidos para generar nuevos poliquetidos para su estudio es muy atractiva. El uso de los métodos del presente invento facilita la clonación de nuevas poliquetido sintetasas, en especial cuando se utilizan vectores basados en el factor F que facilitan la clonación de complejos génicos.

65

Preferentemente, el ADN del complejo genético se liga a un vector, en especial a un vector que además incluye secuencias reguladoras de expresión que pueden controlar y regular la producción de una proteína detectable o la actividad de una disposición relacionada con las proteínas a partir de los complejos génicos ligados. La utilización de

ES 2 277 346 T3

5 vectores con capacidades excepcionalmente amplias para la introducción de ADN exógeno es especialmente apropiada para estos complejos génicos, y se describe a modo de ejemplo en el presente documento para incluir el factor F (o factor de fertilidad) de *E. coli*. Este factor F de *E. coli* es un plásmido que provoca una alta frecuencia de transferencia propia durante la conjugación y es idóneo para obtener y propagar fragmentos grandes de ADN, como complejos génicos procedentes de muestras microbianas mixtas.

10 El término “derivado” o “aislado” significa que el material se ha extraído de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural en el que existe en estado natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que existe en estado natural en un animal vivo no se aísla, pero el mismo polinucleótido o polipéptido sí se aísla si se separa de algunos o todos los materiales con los que coexiste en el sistema natural.

15 Como se ha indicado anteriormente, la genoteca de expresión se puede generar a partir de muestras ambientales, en cuyo caso el ADN se puede aislar sin cultivar un organismo o bien dicho ADN se puede aislar de un organismo cultivado.

20 15 Durante la preparación de la genoteca de expresión, el ADN genómico se puede extraer de un microorganismo cultivado o de una muestra ambiental (por ejemplo, tierra) mediante diversos procedimientos. El ADN aislado o extraído se fragmenta a continuación hasta obtener un tamaño adecuado para la producción de una genoteca de expresión que garantice una probabilidad razonable de que los genes deseados se expresen y criben sin necesidad de cribar un número excesivo de clones. Así, por ejemplo, si el fragmento genómico medio producido mediante cizalladura es de 4,5 kpb, para un genoma de 1,8 Mpb, deberían cribarse unos 2.000 clones para lograr una probabilidad de obtener un gen determinado de aproximadamente el 90%. En algunos casos, especialmente cuando el ADN se aísla sin cultivo, el ADN se amplifica (por ejemplo, mediante PCR) tras el corte por cizalladura.

25 25 El ADN del tamaño deseado se clona en un vector de expresión adecuado y se transforma en un huésped apropiado, preferentemente, un huésped bacteriano y, en concreto, *E. coli*. Aunque es preferible la utilización de *E. coli*, pueden usarse muchos otros huéspedes para producir una genoteca de expresión.

30 30 El vector de expresión que se utiliza preferentemente incluye un promotor que se sabe funcionará en el huésped seleccionado en el caso de que el promotor genómico nativo no funcione en el huésped.

35 A modo de ejemplos representativos de los vectores de expresión que se pueden utilizar para preparar una genoteca de expresión, pueden mencionarse los bacteriófagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales basados en P1, cromosomas artificiales de levadura y cualquier otro vector específico para los huéspedes de interés (como los bacilos, aspergilos, levadura, etc.). El vector puede incluir también una etiqueta de un tipo conocido en la técnica para facilitar la purificación.

40 40 A continuación se explica un procedimiento general para la producción de genotécas de expresión a partir de organismos tanto cultivables como no cultivables.

Organismos cultivables

- 45 Obtención de biomasa
- 45 Aislamiento del ADN (CTAB)
- 50 Cizalladura del ADN (aguja de calibre 25)
- 50 Obtención de ADN romo (nucleasa S1 de *Aspergillus*)
- 55 Metilado (metilasa Eco RI)
- 55 Ligación a ligadores Eco RI (GGAATTCC)
- 55 Corte de los ligadores (endonucleasa de restricción Eco RI)
- 60 Fraccionamiento de tamaño (gradiente de sacarosa)
- 60 Ligación al vector λ (λ ZAP II y λ gt11)
- 65 Empaquetamiento (extracto de empaquetamiento λ *in vitro*)
- 65 Siembra en el huésped *E. coli* y amplificación

ES 2 277 346 T3

Organismos no cultivables

Obtención de células

5 Aislamiento del ADN (varios métodos)

Obtención de ADN romo (nucleasa S1 de *Aspergillus*)

10 Ligación al adaptador que contiene un centro *Not I* y que está conjugado a microesferas magnéticas

15 Ligación del adaptador no conjugado al otro extremo del ADN

Amplificación del ADN en una reacción que permita una elevada fidelidad y utilice secuencias del adaptador como
cebadores

15 Corte del ADN con *Not I*

Fraccionamiento de tamaño (gradiante de sacarosa o columna Sephadryl)

20 Ligación al vector λ (ZAP II λ y gt11 λ)

Empaqueamiento (extracto de empaqueamiento λ *in vitro*)

Siembra en el huésped *E. coli* en placa y amplificación.

25 El ADN sonda utilizado para aislar de forma selectiva el ADN de interés del ADN derivado de, como mínimo, un microorganismo no cultivado puede ser una secuencia de la región codificadora parcial o en toda su longitud del ADN correspondiente a una enzima de actividad conocida, un marcador filogenético u otra secuencia de ADN identificada. La genoteca de ADN original se puede sondear preferentemente con combinaciones de sondas que comprendan como mínimo una parte de la secuencia de ADN que contiene el código de la actividad específica. Estas sondas o genotecas de sondas son preferentemente monocatenarias, y el ADN microbiano que se sondea se ha convertido preferentemente a forma monocatenaria. Las sondas más adecuadas son las que se derivan de enzimas que contienen el código del ADN cuya actividad es similar o igual a la actividad enzimática específica que se va a cribar.

35 El ADN sonda debería incluir como mínimo 10 bases y, preferentemente, un mínimo de 15 bases. En una forma de realización, puede utilizarse la totalidad de la región codificadora como sonda. Las condiciones para la hibridación en la que el ADN se aísla de forma selectiva utilizando como mínimo un ADN sonda se establecerán de modo que se determinen unas condiciones restrictivas para la hibridación en una identidad secuencial de, como mínimo, aproximadamente el 50% y, más concretamente, unas condiciones restrictivas que determinen una identidad secuencial de, como mínimo, aproximadamente el 70%.

40 Las técnicas de hibridación para sondear una genoteca de ADN microbiano con la finalidad de aislar ADN de interés potencial son muy conocidas en la técnica, y todas las descritas en la literatura especializada son aptas para su utilización en el presente invento, especialmente aquellas que emplean un ADN sonda ligado en fase sólida, directa o indirectamente, para facilitar la separación del ADN restante derivado de microorganismos.

45 Preferentemente el ADN sonda se “etiqueta” con una pareja de un par de enlace específico (esto es, un ligando) y la otra pareja del par se une a una matriz sólida para facilitar la separación de la diana de su fuente. El ligando y la pareja de enlace específica pueden seleccionarse en cualquier orientación de los siguientes: (1) un antígeno o hapteno y un anticuerpo o fragmento de enlace específico del mismo; (2) biotina o iminobiotina y avidina o estreptavidina; (3) un azúcar y una lectina específica para él; (4) una enzima y un inhibidor para ella; (5) una apoenzima y un cofactor; (6) oligonucleótidos homopoliméricos complementarios, y (7) una hormona y un receptor para ella. La fase sólida se selecciona preferentemente de: (1) una superficie polimérica o de vidrio; (2) una columna empaquetada de microesferas poliméricas, y (3) partículas magnéticas o paramagnéticas.

50 La genoteca de clones preparada de la manera descrita anteriormente se puede cribar directamente para localizar una actividad deseada, por ejemplo enzimática, sin necesidad de expandir o amplificar los cultivos o realizar otros procedimientos adicionales. No obstante, en una forma de realización preferente, se considera conveniente amplificar el ADN aislado de los clones individuales mediante, por ejemplo, PCR.

55 Además, es opcional, aunque conveniente, realizar una amplificación del ADN diana que se ha aislado. En esta forma de realización, el ADN aislado de manera selectiva se separa del ADN sonda tras el aislamiento. A continuación, se amplifica antes de utilizarse para la transformación de los huéspedes. El ADN bicatenario seleccionado para incluir por lo menos como una parte del mismo una secuencia de ADN predeterminada se puede convertir en monocatenario, sometido a amplificación e hibridado nuevamente para proporcionar diversas amplificaciones del ADN bicatenario seleccionado. La técnica dispone actualmente de numerosas metodologías de amplificación conocidas.

ES 2 277 346 T3

El ADN seleccionado se utiliza a continuación para preparar una genoteca para el cribado mediante la transformación de un organismo adecuado. Los huéspedes, especialmente los identificados en el presente documento como preferentes, se transforman mediante la introducción artificial por inoculación de los vectores que contienen el ADN diana en condiciones propicias para dicha transformación.

- 5 Algunos ejemplos representativos de los vectores de expresión que se podrían utilizar son las partículas víricas, baculovirus, bacteriófagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmedos, cromosomas bacterianos artificiales, ADN vírico (por ejemplo, variolovacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, seudorrabia y derivados del SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura y cualquier otro vector 10 específico para los huéspedes de interés (como bacilos, aspergilos, levadura, etc.). Así pues, y a modo de ejemplo, el ADN se puede incluir en cualquiera de los diversos vectores de expresión para la expresión de un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN sintético, cromosómico y no cromosómico. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y disponibles en el mercado. Los vectores siguientes se proporcionan a modo de ejemplo: Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SK, pBluescript KS, 15 pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); pTRC99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); Eucarióticos: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). No obstante, puede utilizarse cualquier otro vector o plásmido siempre y cuando sea replicable y viable en el huésped.
- 20 Un tipo especialmente preferente de vector para el uso en el presente invento contiene un factor F como origen de replicación. El factor F (o factor de fertilidad) de *E. coli* es un plásmido que provoca una alta frecuencia de transferencia propia durante la conjugación y, con menos frecuencia, la transferencia del propio cromosoma bacteriano. Una forma de realización especialmente preferente consiste en utilizar vectores de clonación, denominados vectores “fósmedos” o vectores de cromosomas artificiales bacterianos (BAC, en sus siglas en inglés). Derivan del factor F de 25 *E. coli* y pueden integrar de manera estable segmentos grandes de ADN genómico. Al integrarse con ADN procedente de una muestra ambiental mixta sin cultivar, se pueden obtener fragmentos genómicos grandes en forma de “genoteca de ADN ambiental” estable.

El ADN derivado de uno o varios microorganismos puede introducirse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en uno o varios centros de endonucleasa de restricción adecuados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se considera que están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

La secuencia de ADN del vector de expresión se liga operativamente a una o varias secuencias de control de la expresión adecuadas (promotor) para dirigir la síntesis del ARNm. Algunos promotores bacterianos especialmente conocidos son lacI, lacZ, T3, T7, gpt, λ P_R, P_I y trp. Los promotores eucarióticos incluyen el inmediato temprano de CMV, la timidina quinasa de HSV, el temprano y el tardío de SV40, las secuencias promotoras LTR de los retrovirus y la metalotioneína-1 murina. La selección del vector y el promotor adecuados es posible con unos conocimientos medios de la técnica. El vector de expresión también contiene un centro de unión al ribosoma para la iniciación 40 de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias adecuadas para la amplificación de la expresión. Las regiones promotoras se pueden seleccionar de cualquier gen deseado utilizando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables.

Además, los vectores de expresión contienen preferentemente uno o más genes marcadores seleccionables para 45 aportar un rasgo fenotípico para la selección de las células huésped transformadas, como la dihidrofolato reductasa o la resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o como la resistencia a la ampicilina y tetraciclina de *E. coli*.

Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ejemplo, el gen de la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. Cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en dirección 3'. Dichos promotores pueden derivar de operones que contienen el código de enzimas glucolíticas como la 3-fosfoglicerato-cinasa (FGC), el factor α, la fosfatasa ácida o las proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se forma en la fase adecuada con las secuencias de iniciación 55 y terminación de la traducción y, preferentemente, también con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al interior del espacio periplásmico o medio extracelular.

El ADN seleccionado y aislado como se ha descrito anteriormente se introduce en un huésped adecuado para preparar una genoteca, que se cribará para localizar la actividad enzimática deseada. El ADN seleccionado ya se encuentra preferentemente en un vector que incluye las secuencias de control adecuadas a través de las cuales se puede expresar el ADN seleccionado que contiene el código de una enzima para facilitar la detección de la actividad que se busca. La célula huésped puede ser una célula eucariótica superior, como una célula de un mamífero, o una célula eucariótica inferior, como una célula de levadura, o bien la célula huésped puede ser una célula procariótica, como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transformación, 60 transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, DMSO o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, L., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)).

ES 2 277 346 T3

Como ejemplos representativos de huéspedes adecuados pueden mencionarse: células bacterianas, como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas, como levadura; células de insectos, como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales, como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus, células de especies vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera al alcance de los expertos en la técnica del presente invento.

Las células huésped se someten a ingeniería genética (son transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores. Las células huésped modificadas genéticamente pueden cultivarse en medios nutritivos convencionales modificados de manera adecuada para la activación de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes. Las condiciones de cultivo, como temperatura, pH y otros, son las utilizadas previamente para las células huésped seleccionadas para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la técnica con conocimientos medios.

Las enzimas recombinantes de la genoteca que se clasifican del modo descrito en el presente documento pueden o no secuenciarse y pueden o no presentar una forma purificada. Por lo tanto, de acuerdo con el presente invento, existe la posibilidad de clasificar una o más enzimas recombinantes antes o después de obtener la secuencia de la enzima o bien antes o después de purificar la enzima para obtener una homogeneidad esencial.

El cribado para la localización de características químicas puede efectuarse en clones de expresión individuales o bien puede efectuarse inicialmente en una mezcla de clones de expresión para determinar si la mezcla dispone de una o varias actividades enzimáticas específicas. Si la mezcla presenta una actividad enzimática específica, los clones individuales se pueden cribar nuevamente para localizar dicha actividad enzimática u otra actividad más específica. Así pues, y a modo de ejemplo, si una mezcla de clones muestra actividad hidrolásica, pueden extraerse y cribarse cada una de los clones para determinar cuáles de ellos muestran dicha actividad.

En el presente documento se describen también los kits enzimáticos para el uso en cribados o investigaciones posteriores. Así, un paquete o kit reactivo se prepara colocando en el kit o paquete, por ejemplo, en recipientes adecuados, un mínimo de tres enzimas recombinantes diferentes, cada una de las cuales debe compartir como mínimo dos características enzimáticas. Preferentemente, una característica común será una propiedad o característica química, y la otra característica común será una propiedad o característica física. No obstante, se pueden preparar kits que comparten dos o más propiedades o características químicas y no comparten ninguna propiedad o característica física, y viceversa.

Dado que, de conformidad con el presente invento, existe la posibilidad de generar una genoteca de enzimas recombinantes a partir de uno o varios microorganismos que se clasifique en función de múltiples propiedades físicas, químicas o de ambos tipos, existe la posibilidad de preparar una serie de kits o paquetes enzimáticos con una serie de características físicas, químicas o de ambos tipos seleccionadas que puedan formularse de manera que contengan tres o más enzimas recombinantes, de las que como mínimo tres, y preferentemente todas ellas, comparten como mínimo una característica química y una característica física. Este kit debería incorporar una etiqueta apropiada que especifique dichas características comunes.

Por ejemplo, como mínimo tres enzimas recombinantes del kit tienen en común la característica química más específica indicada en la etiqueta. El término "etiqueta" se utiliza en su sentido más amplio e incluye documentación anexa al paquete o literatura asociada o distribuida junto con el kit o paquete. Así pues, por ejemplo, si en la etiqueta del kit figura un sustrato concreto (uno de los ejemplos anteriores del nivel 3), entonces como mínimo tres de las enzimas del kit actuarían sobre dicho sustrato.

Preferiblemente, los kits incluirán más de tres enzimas, por ejemplo, cinco, seis o más y, en una forma de realización preferente, como mínimo tres, preferiblemente la mayor parte de las mismas y, en algunos casos, todas las enzimas recombinantes del kit tendrán un mínimo de dos propiedades o características enzimáticas en común, tal y como se ha descrito con anterioridad.

Las enzimas recombinantes de los kits pueden incluir dos o más enzimas en un único recipiente, un recipiente para cada una de las enzimas o bien diversas combinaciones de ambos modos.

La genoteca se puede cribar en busca de una actividad enzimática específica por medio de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad enzimática se puede cribar para una o varias de las seis clases que determina la IUB: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas isomerasas y ligasas. Entonces, las enzimas recombinantes que ofrecen resultados positivos para una o varias de las clases de la IUB se pueden volver a cribar en busca de una actividad enzimática todavía más específica.

Como alternativa, la genoteca se puede cribar para encontrar una actividad enzimática más especializada. Por ejemplo, en lugar de realizar un cribado genérico en busca de actividad hidrolásica, la genoteca se puede cribar en busca de una actividad más especializada, como por ejemplo, el tipo de enlace sobre el que actúa la hidrolasa. Así pues, y a modo de ejemplo, la genoteca se puede cribar para determinar las hidrolasas que actúan sobre una o varias funciones químicas más específicas, como: (a) amida (enlaces peptídicos), esto es, proteasas; (b) enlaces éster, esto es, esterasas y lipasas; y (c) acetales, esto es, glucosidasas, etc.

ES 2 277 346 T3

Entonces, los clones que se identifican como poseedores de la actividad enzimática especificada se pueden secuenciar para identificar la secuencia de ADN que contiene el código de una enzima que presenta la actividad específica. En consecuencia, de conformidad con el presente invento, existe la posibilidad de aislar e identificar: (i) ADN que contiene el código de una enzima con una actividad enzimática específica; (ii) enzimas que tienen dicha actividad (incluida su secuencia de aminoácidos); y (iii) producir las enzimas que presentan dicha actividad.

El cribado para localizar una actividad enzimática se puede llevar a cabo en clones de expresión individuales o bien se puede realizar inicialmente en una mezcla de clones de expresión para determinar si la mezcla presenta una o varias de las actividades enzimáticas especificadas. Si la mezcla tiene una actividad enzimática especificada, 10 entonces los clones individuales se pueden cribar nuevamente en busca de la citada actividad enzimática o de otra más específica. Así pues, y a modo de ejemplo, si una mezcla de clones presenta actividad hidrolásica, entonces cada uno de los clones se puede aislar y cribar para determinar cuáles de estos clones presentan actividad hidrolásica.

15 Las genotecas de expresión se pueden cribar para detectar una o varias características químicas seleccionadas. Las características químicas representativas seleccionadas se describen más adelante, pero tales características no constituyen una limitación para el presente invento. Además, las genotecas de expresión se pueden cribar en busca de todas o algunas de estas características. En consecuencia, algunas de las características químicas especificadas en el presente documento se pueden determinar en todas las genotecas, ninguna de ellas o bien sólo en algunas.

20 Asimismo, las enzimas recombinantes también se pueden someter a prueba y clasificar según propiedades físicas. Por ejemplo, las enzimas recombinantes se pueden clasificar según propiedades físicas del modo siguiente:

25 *Óptimos de pH*

- <3
- 30 3-6
- 6-9
- 9-12
- 35 >12

Óptimos de temperatura

- 40 >90°C
- 45 75-90°C
- 50 60-75°C
- 55 45-60°C
- 60 30-45°C
- 65 15-30°C
- 70 0-15°C

55 *Estabilidad térmica*

- Semivida a:
- 60 90°C
- 65 75°C
- 70 60°C
- 75 45°C

ES 2 277 346 T3

Tolerancia a disolventes orgánicos

Hidromiscible

5 (DMF)

90%

75%

10 45%

30%

15 No hidromiscible

Hexano

Tolueno

20 Selectividad frente a iones metálicos

EDTA - 10 mM

25 Ca⁺² - 1 mM

Mg⁺² - 100 μM

30 Mn⁺² - 10 μM

Co⁺³ - 10 μM

Sensibilidad al detergente

35 Neutro (tritón)

Aniónico (deoxicolato)

40 Catiónico (CHAPS).

Las enzimas recombinantes de las genotecas de este invento se pueden utilizar con múltiples fines, y el presente invento, al proporcionar diversas enzimas recombinantes clasificadas según múltiples características enzimáticas distintas, permite realizar un rápido cribado de enzimas para múltiples aplicaciones. Así, y a modo de ejemplo, se describe un conjunto de kits enzimáticos que contienen diversas enzimas capaces de actuar sobre un enlace o sustrato específico a unas condiciones especificadas para poder cribar las enzimas para múltiples aplicaciones. A continuación se recogen algunos ejemplos de tales aplicaciones:

1. Lipasa/esterasa

50 a. Hidrólisis enantioselectiva de ésteres (lípidos)/tioésteres

1) Resolución de mezclas racémicas

55 2) Síntesis de alcoholes o ácidos ópticamente activos de mesodiésteres

b. Síntesis selectivas

60 1) Hidrólisis regioespecífica de ésteres de hidratos de carbono

2) Hidrólisis selectiva de alcoholes secundarios cíclicos

65 c. Síntesis de alcoholes, ácidos, lactonas y ésteres ópticamente activos

1) Transesterificación de ésteres activados/no activados

2) Interesterificación

ES 2 277 346 T3

- 3) Lactonas ópticamente activas procedentes de hidroxiésteres
- 4) Apertura enantioselectiva o regioselectiva del anillo de anhídridos

5 d. Detergentes

e. Conversión grasa/aceite

f. Maduración del queso

10

2. *Proteasa*

a. Síntesis éster/amida

15 b. Síntesis peptídica

c. Resolución de mezclas racémicas de ésteres de aminoácidos

20 d. Síntesis de aminoácidos no naturales

e. Hidrólisis de detergentes/proteínas

25 3. *Glucosidasa/glicosil transferasa*

a. Síntesis azúcares/polímeros

b. Escisión de ligamientos glucosídicos para formar mono, di y oligosacáridos

30 c. Síntesis de oligosacáridos complejos

d. Síntesis de glucósido con UDP-galactosil transferasa

35 e. Transglucosilación de disacáridos, glucosil fluoruros, aril galactósidos

f. Transferencia de glucosil en la síntesis de oligosacáridos

40 g. Escisión diastereoselectiva de β -glucosilsulfóxidos

h. Glucosilaciones asimétricas

i. Procesamiento alimentario

45 j. Procesamiento de papel

4. *Fosfatasa/quinasa*

50 a. Síntesis/hidrólisis de ésteres de fosfato

1) Fosforilación enantioselectiva y regioselectiva

2) Introducción de ésteres de fosfato

55 3) Síntesis de precursores fosfolipídicos

4) Síntesis controlada de polinucleótidos

60 b. Activación de moléculas biológicas

c. Formación de enlaces de fosfato selectivos sin grupos de protección

65

ES 2 277 346 T3

5. Mono/dioxigenasa

- a. Oxifuncionalización directa de sustratos orgánicos no activados
- 5 b. Hidroxilación de alkanos, aromáticos y esteroides
- c. Epoxidación de alquenos
- 10 d. Sulfoxidación enantioselectiva
- e. Oxidaciones Bayer-Villiger regioselectivas y estereoselectivas

6. Haloperoxidasa

- 15 a. Adición oxidante de iones de haluro a centros nucleofílicos
- b. Adición de ácidos hipohalosos a enlaces olefínicos
- 20 c. Escisión del anillo de ciclopropanos
- d. Sustratos aromáticos activados convertidos a derivados orto y para
- e. 1,3-dicetonas convertidas a derivados 2-halo
- 25 f. Oxidación heteroatómica de sustratos que contienen azufre y nitrógeno
- g. Oxidación de acetatos de enol, alquinos y anillos aromáticos activados

7. Lignina peroxidasa/diarilpropreno peroxidasa

- 30 a. Escisión oxidante de enlaces C-C
- b. Oxidación de alcoholes bencílicos para su conversión en aldehídos
- c. Hidroxilación de carbonos bencílicos
- 35 d. Dimerización de fenoles
- e. Hidroxilación de enlaces dobles para formar dioles
- f. Escisión de aldehídos de lignina

8. Epóxido hidrolasa

- 45 a. Síntesis de compuestos bioactivos enantioméricamente puros
- b. Hidrólisis regioselectiva y enantioselectiva de epóxido
- c. Epoxidación aromática y olefínica mediante la formación de epóxidos a partir de monooxigenasas
- d. Resolución de epóxidos racémicos
- 55 e. Hidrólisis de epóxidos de esteroides

9. Nitrilo hidratasa/nitrilasa

- 60 a. Hidrólisis de nitrilos alifáticos para su conversión en carboxamidas
- b. Hidrólisis de nitrilos alifáticos insaturados, heterocíclicos y aromáticos para su conversión en los ácidos correspondientes
- 65 c. Hidrólisis de acrilonitrilos

- d. Producción de carboxamidas, compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos (nicotinamida, picolinamida, isonicotinamida)
- e. Hidrólisis regioselectiva de dinitrilo acrílico
- f. α -aminoácidos a partir de α -hidroxinitrilos

5 10. *Transaminasa*

- a. Transferencia de grupos amino en oxoácidos

15 11. *Amidasa/acilasa*

- a. Hidrólisis de amidas, amidinas y otros enlaces C-N
- b. Síntesis y resolución de aminoácidos no naturales.

20 El invento se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, los mismos no constituyen una limitación para el alcance del presente invento. A no ser que se especifique lo contrario, todas las partes son por peso.

25 Ejemplo 1

Producción de una genoteca de expresión

A continuación se describe un procedimiento representativo para la preparación de una genoteca de expresión para su cribado según el enfoque por niveles del presente invento.

30 Un gramo de sedimento celular de *Thermococcus GU5L5* se sometió a lisis y el ADN se aisló según los procedimientos descritos en la literatura (*Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1, 1987). Se resuspendieron aproximadamente 100 μ g del ADN aislado en tampón TE y se pasaron con fuerza por una aguja de calibre 25 con doble cámara hasta que los fragmentos cizallados que se obtuvieron presentaron un tamaño comprendido en el rango 0,5-10,0 Kb (media de 3,0 Kb). Se obtuvieron extremos romos de ADN con nucleasa S1 de *Aspergillus* (300 unidades a 37°C durante 15 minutos) y los centros de restricción EcoRI del ADN diana se protegieron con EcoRI metilasa (200 unidades a 37°C durante 1 hora). Los ligadores EcoRI [GGAATTCC] se ligaron al ADN protegido/romo con extremos de ligadores de 10 picomoles al extremo de ADN diana de 1 picomol. Los ligadores se cortaron con endonucleasas de restricción EcoRI (200 unidades a 37°C durante 1,5 horas) y el tamaño del ADN se fraccionó por el gradiente de la sacarosa (Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1982). El ADN diana preparado se ligó al vector λ ZAP® II (Stratagene), se empaquetó con extractos de empaquetamiento λ *in vitro* y se diferenció en la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF según las instrucciones del fabricante. Los fagémidos pBluescript® se escindieron de la genoteca λ y diferenciaron en canamicina DH10B F' de *E. coli*, según el método de Hay y Short (Hay y Short, J., *Strategies*, 5:16, 1992). Las colonias resultantes se recogieron con palillos estériles y se utilizaron para inocular de uno en uno todos los pocillos de las 11 placas de microvaloración de 96 pocillos (1.056 clones en conjunto). Los pocillos contenían 250 μ L de medios LB con 100 μ g/mL de ampicilina, 80 μ g/mL de meticilina y glicerol al 10% v/v (LB ampicilina/meticilina, glicerol). Las células se diferenciaron durante toda la noche a 37°C sin agitación. De este modo se generó la “genoteca original”. Cada pocillo de la genoteca original contenía un cultivo madre de células de *E. coli*, cada una de las cuales contenía un fagémido pBluescript con un inserto de ADN único.

55 Ejemplo 2

Preparación de un genoteca de ADN

A continuación se resume el procedimiento empleado para generar una genoteca a partir de una muestra de la superficie exterior de una hueso de ballena hallado a 1.240 metros de profundidad en la cuenca de Santa Catalina durante una expedición de buceo.

60 Aislamiento del ADN

Procedimiento IsoQuick según las instrucciones del fabricante.

Cizalladura del ADN

- 65 1. Empujar y tirar con fuerza del émbolo de jeringuillas de 1 cc y una aguja de doble cámara de calibre 25G unas 500 veces.

ES 2 277 346 T3

2. Comprobación de una pequeña cantidad ($0,5 \mu\text{g}$) en un gel de agarosa al 0,8% para garantizar que la mayoría del ADN se encuentra dentro del intervalo que se desea (aproximadamente 3-6 kb).

5 *Obtención de ADN romo*

1. Adición de:

10 H₂O Hasta un volumen final de 405 μL
 45 μL Tampón de Aspergillus 10X
 2,0 μL Nucleasa S1 de Aspergillus (150 u/ μL)

- 15 2. Incubación a 37°C durante 15 minutos.

- 20 3. Extracción con fenol/cloroformo una vez.

- 25 4. Extracción con cloroformo una vez.

- 30 5. Adición de 1 ml de etanol frío para la precipitación.

- 35 6. Colocación en hielo durante 10 minutos.

- 40 7. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 30 minutos.

- 45 8. Lavado con 1 ml de etanol al 70%.

- 50 9. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 10 minutos y secado.

Metilación del ADN

1. Resuspensión del ADN en 26 μL de TE con sumo cuidado.

- 35 2. Adición de:

40 4,0 μL Tampón de metilasa EcoR I 10X
 0,5 μL SAM (32 mM)
 5,0 μL Metilasa EcoR I (40 u/ μL)

- 45 3. Incubación a 37°C durante 1 hora.

Obtención de extremos romos

1. Adición a la reacción de metilación de:

50 5,0 μL MgCl₂ 100 mM
 8,0 μL Mezcla de dNTP (2,5 mM de cada dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
 4,0 μL ADN-polimerasa dirigida por ADN (5 u/ μL)

- 55 2. Incubación a 12°C durante 30 minutos.

- 60 3. Adición de 450 μL de STE IX.

- 65 4. Extracción con fenol/cloroformo una vez.

- 70 5. Extracción con cloroformo una vez.

- 75 6. Adición de 1 ml de etanol frío para la precipitación y colocación en hielo durante 10 minutos.

- 80 7. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 30 minutos.

ES 2 277 346 T3

8. Lavado con 1 ml de etanol al 70%.
9. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 10 minutos y secado.

5

Ligación de los ligadores

1. Resuspensión del ADN en 7 μ L de Tris-EDTA (TE) con sumo cuidado.
- 10 2. Adición de:

14 μ L	Ligadores EcoR I fosforilados (200 ng/ μ L)
3,0 μ L	Tampón de ligación 10X
15 3,0 μ L	rATP 10 mM
3,0 μ L	T4 ADN ligasa (4 unidades Weiss/ μ L)
- 20 3. Incubación a 4°C durante toda la noche.

Corte con EcoRI

- 25 1. Detención de la reacción de ligación por calor a 68°C durante 10 minutos.
2. Adición de:

237,9 μ L	H ₂ O
30 30 μ L	Tampón EcoR I 10X
2,1 μ L	Enzima de restricción EcoR I (100 u/ μ L)
- 35 3. Incubación a 37°C durante 1,5 horas.
4. Adición de 1,5 μ L de EDTA 0,5 M.
5. Colocación en hielo.

40

Fraccionamiento de tamaño por gradiente de sacarosa (2,2 ml)

- 45 1. Calentamiento de la muestra a 65°C durante 10 minutos.
2. Carga en un gradiente de sacarosa de 2,2 ml con sumo cuidado.
3. Centrifugado en miniultracentrifugadora a 45 K y 20°C durante 4 horas sin freno.
- 50 4. Recogida de las fracciones al perforar la parte inferior del tubo del gradiente con una aguja de calibre 20G y dejar que la sacarosa pase por la aguja. Recogida de las 20 primeras gotas en un tubo Falcon 2059; a continuación, recogida de 10 fracciones de una gota (etiquetadas de la 1 a la 10). El volumen de cada gota es de aproximadamente 60 μ L.
- 55 5. Paso de 5 μ L de cada fracción por gel de agarosa al 0,8% para comprobar su tamaño.
6. Mezcla de las fracciones de la 1 a la 4 (-10-1,5 kb) y, en otro tubo, las de la 5 a la 7 (aproximadamente 5-0,5 kb).
7. Adición de 1 ml de etanol frío para la precipitación y colocación en hielo durante 10 minutos.
8. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 30 minutos.
9. Lavado con 1 ml de etanol al 70%.
- 65 10. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 10 minutos y secado.

ES 2 277 346 T3

11. Resuspensión de cada fracción en 10 μL de tampón TE.

Ligación de prueba a los brazos λ

- 5 1. Análisis de la placa para obtener una concentración aproximada. Disposición de 0,5 μl de la muestra en agarosa que contenga bromuro de etidio junto con los estándares (las muestras de ADN cuya concentración es conocida). Visualización en luz ultravioleta y cálculo de la concentración en comparación con los estándares.

10 Fracción 1-4 = >1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Fracción 5-7 = 500 ng/ μl .

- 15 2. Preparación de las reacciones de ligación siguientes (reacciones de 5 μl) e incubación a 4°C durante toda la noche:

Muestra	H ₂ O	Tampón ligasa 10X	rATP 10 mM	Brazos λ (gt11 y ZAP)	Inserción de ADN	T4 ADN ligasa (4 uni- dades Weiss/ μl)
Fracción 1-4	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL	1,0 μL	2,0 μL	0,5 μL
Fracción 5-7	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL	1,0 μL	2,0 μL	0,5 μL

40 *Preparación de placas y empaquetamiento de prueba*

1. Empaqueamiento de las reacciones de ligación siguiendo el protocolo del fabricante. Empaqueamiento de 2,5 μl por extracto de empaquetamiento (2 extractos por ligación).

- 45 2. Detención de las reacciones de empaquetamiento con 500 μl de tampón SM y mezcla del empaquetamiento procedente de la misma ligación.

- 50 3. Cuantificación de 1,0 μl de cada en un huésped adecuado (Absorbancia₆₀₀ = 1,0) [XLI-Blue MRF para ZAP e Y1088 para gt11].

Adición de 200 μl de células huésped (en mM de MgSO₄) a tubos Falcon 2059.

Inoculación con 1 μl de bacteriófago empaquetado.

55 Incubación a 37°C durante 15 minutos.

Adición de aproximadamente 3 ml de agar a 48°C como capas adicionales.

60 [50 ml de la disolución madre que contiene 150 μl de IPTG (0,5 M) y 300 μl de X-GAL (350 mg/ml)]

Preparación de placas en placas de 100 mm e incubación a 37°C durante toda la noche.

- 65 4. Resultados de eficiencia:

gt11: 1,7 x 10⁴ recombinantes con 95% de fondo

ZAP II: 4,2 x 10⁴ recombinantes con 66% de fondo

ES 2 277 346 T3

Los contaminantes de la muestra de ADN pueden haber inhibido las reacciones enzimáticas, a pesar de que el gradiente de sacarosa y las extracciones orgánicas pueden haberlos eliminado. Puesto que la muestra de ADN era costosa, se llevó a cabo un esfuerzo para “fijar” los extremos para la clonación:

5 Nueva obtención de ADN romo

1. Mezcla de todo el ADN sobrante no ligado a los brazos λ (fracciones 1-7) y adición de H₂O hasta un volumen final de 12 μ l. A continuación, adición de:

10	143 μ l	H ₂ O
	20 μ l	Tampón 2 10X (del kit de síntesis de ADNc de Stratagene)
15	23 μ l	dNTP para conversión en romo (del kit de síntesis de ADNc de Stratagene)
	2,0 μ l	Pfu (del kit de síntesis de ADNc de Stratagene)

2. Incubación a 72°C durante 30 minutos.
3. Extracción con fenol/cloroformo una vez.
4. Extracción con cloroformo una vez.
5. Adición de 20 μ l de NaOAc 3M y 400 μ l de etanol frío para la precipitación.
- 25 6. Colocación a -20°C durante toda la noche.
7. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 30 minutos.
- 30 8. Lavado con 1 ml de etanol al 70%.
9. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 10 minutos y secado.

El ADN NO se debe metilar, puesto que ya se metiló en la primera parte del procesamiento.

35

Ligación del adaptador

- 40 1. Resuspensión del ADN en 8 μ l de adaptadores EcoR I con sumo cuidado (del kit de síntesis de ADNc de Stratagene).

2. Adición de:

45	1,0 μ l	Tampón de ligación 10X
	1,0 μ l	rATP 10 mM
	1,0 μ l	T4 ADN ligasa (4 unidades Weiss/ μ l)

- 50 3. Incubación a 4°C durante 2 días.

No se deben cortar, puesto que, en esta ocasión, se utilizan ADAPTADORES. En cambio, se deben fosforilar.

55 Fosforilación de los adaptadores

1. Detención de la reacción de ligación por calor a 70°C durante 30 minutos

2. Adición de:

60	1,0 μ l	Tampón de ligación 10X
	2,0 μ l	rATF 10 mM
65	6,0 μ l	H ₂ O
	1,0 μ l	PNK (del kit de síntesis de ADNc de Stratagene)

ES 2 277 346 T3

3. Incubación a 37°C durante 30 minutos.
4. Adición de 31 μ l de H₂O y 5 μ l de STE 10X.
5. Fraccionamiento de tamaño en una columna de centrifugación Sephadryl S-500 (mezcla de las fracciones de la 1 a la 3).
6. Extracción con fenol/cloroformo una vez.
- 10 7. Extracción con cloroformo una vez.
8. Adición de etanol frío para la precipitación.
9. Colocación en hielo durante 10 minutos.
- 15 10. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 30 minutos.
11. Lavado con 1 ml de etanol al 70%.
- 20 12. Centrifugado en microcentrifugadora a alta velocidad durante 10 minutos y secado.
13. Resuspensión en 10,5 μ l de tampón TE.

No se debe efectuar el análisis de la placa. En cambio, se debe realizar una ligación directa a los brazos como se ha descrito con anterioridad excepto por la utilización de 2,5 μ l de ADN y la no utilización de agua.

Empaqueamiento y valoración tal y como se ha descrito con anterioridad

Resultados de eficiencia:

30 gt11: 2,5 x 10⁶ recombinantes con 2,5% de fondo

ZAP II: 9,6 x 10⁵ recombinantes con 0% de fondo

Amplificación de genotecas (5,0 x 10⁵ recombinantes de cada genoteca)

1. Adición de 3,0 ml de células huésped (Absorbancia₆₆₀ = 1,0) en dos tubo cónicos de 50 ml.
2. Inoculación con 2,5 x 10³ pfu por tubo cónico.
3. Incubación a 37°C durante 20 minutos.
4. Adición de capas superiores de agar a cada tubo hasta un volumen final de 45 ml.
- 45 5. Colocación del contenido del tubo en cinco placas de 150 mm.
6. Incubación a 37°C durante 6-8 horas o hasta que el contenido de las placas presente aproximadamente el tamaño de la cabeza de un alfiler.
- 50 7. Cubrir con 8-10 ml de tampón SM y colocar a 4°C durante toda la noche (si es posible, con agitación por balanceo con sumo cuidado).

55 Recogida de bacteriófagos

1. Recuperación de la suspensión de bacteriófagos al verter el tampón SM fuera de cada placa en un tubo cónico de 50 ml.
2. Adición de 3 ml de cloroformo, agitación con fuerza de la solución e incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Centrifugado a 2K rpm durante 10 minutos para la extracción de los residuos celulares.
- 65 4. Vertido de sobrenadante en un matraz estéril y adición de 500 μ l de cloroformo.
5. Almacenamiento a 4°C.

ES 2 277 346 T3

Cuantificación de la genoteca amplificada

1. Realización de diluciones sucesivas:

5 10^5 = 1 μ l de bacteriófago amplificado en 1 ml de tampón SM

10 10^6 = 1 μ l de la dilución 10^{-3} en 1 ml de tampón SM

2. Adición de 200 μ l de células huésped (en MgSO₄ 10 mM) en dos tubos.

10 3. Inoculación de 10 μ l de la dilución 10^{-6} (10^{-5}) en uno de los tubos.

15 4. Inoculación de 1 μ l de la dilución 10^{-6} (10^{-6}) en el otro tubo.

15 5. Incubación a 37°C durante 15 minutos.

15 6. Adición de aproximadamente 3 ml de capas adicionales de agar a 48°C.

20 [50 ml de la solución madre que contenga 150 μ l de IPTG (0,5 M) y 375 μ l de X-GAL (350 mg/ml)]

20 7. Colocación en placas de 100 mm e incubación a 37°C durante toda la noche.

8. Resultados:

25 gt11: 1,7 x 10^{11} /ml

25 ZAP II: 2,0 x 10^{10} /ml

Escisión de la genoteca ZAP II para crear la genoteca pBluescript.

Ejemplo 3

Preparación de una genoteca de ADN procariótico sin cultivar

35 En la figura 1 se muestra una vista general de los procedimientos utilizados para crear una genoteca ambiental a partir de una muestra mixta de picoplantón. El objetivo consistía en crear una genoteca de insertos de ADN amplia y estable que representara el ADN genómico del picoplantón.

40 *Recogida de células y preparación del ADN.* Se prepararon bloques de agarosa que contenían células de picoplantón concentrado a partir de muestra recogidas en un crucero oceanográfico de Newport (Oregón) a Honolulu (Hawai). Se recogió agua marina (30 litros) en botellas Niskin; se cribó mediante 10 μ m de Nitex y se concentró mediante filtración por fibras huecas (Amicon DC10) a través de filtros de polisulfona de corte con un peso molecular de 30.000. Las células de bacteriplancton concentrado se recogieron en un filtro Durapore de 47 mm y 0,22 μ m, y se resuspendieron en 1 ml de tampón STE 2X (NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, Tris 10 mM, pH 8,0) hasta una densidad final aproximada de 1 x 10^{10} células por ml. La suspensión celular se mezcló con un volumen de agarosa LMP Seaplaque fundida al 1% (FMC) enfriada a 40°C y, a continuación, pasada inmediatamente a una jeringuilla de 1 ml. Dicha jeringuilla se cerró herméticamente con parafilm y se colocó en hielo durante 10 minutos. El bloque de agarosa que contenía las células se extruyó dentro de un tampón de lisis de 10 ml (Tris 10 mM de pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 M, sarcosil al 1%, deoxicolato de sodio al 0,2%, 1 mg/ml de lisozima) y se incubó a 37°C durante una hora. Entonces, el bloque de agarosa se transfirió a 40 ml de tampón ESP (sarcosil al 1%, 1 mg/ml de proteinasa K en EDTA 0,5 M) y se incubó a 55°C durante 16 horas. La solución se decantó y sustituyó por tampón ESP nuevo y se incubó a 55°C durante otra hora más. Después, los bloques de agarosa se colocaron en EDTA 50 mM y se almacenaron a 4°C a bordo de la embarcación durante el resto del crucero oceanográfico.

55 Una rodaja de un bloque de agarosa (72 μ l) preparada a partir de una muestra recogida en la costa de Oregón se dializó durante toda la noche a 4°C contra 1 mL del tampón A (NaCl 100 mM, bis-tris-propano-HCl 10 mM, 100 μ g/ml de BSA acetilado, pH 7,0 a 25°C) en un tubo de microcentrifugadora de 2 mL. La solución se sustituyó por 250 μ L de tampón A nuevo que contenía MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM, y se incubó en una plataforma basculante durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la solución se pasó a 250 μ L del mismo tampón que contenía 4 U de Sau3A1 (NEB), se equilibró a 37°C en un baño de agua y, a continuación, se incubó en una plataforma basculante en un incubador a 37°C durante 45 minutos. El bloque se transfirió a un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml y se incubó a 68°C durante 30 minutos para inactivar la proteína, por ejemplo, una enzima, y fundir la agarosa. La agarosa se digirió y el ADN se desfosforiló con gelasa y HK fosfatasa (Epicentre), respectivamente, según las recomendaciones del fabricante. La proteína se extrajo mediante una cuidadosa extracción con fenol/cloroformo y el ADN se precipitó mediante el uso de etanol, se sedimentó y, finalmente, se lavó con etanol al 70%. Este ADN parcialmente digerido se resuspendió en H₂O estéril hasta obtener una concentración de 2,5 ng/ μ l para la ligación con el vector pFOS1.

ES 2 277 346 T3

Los resultados de la amplificación por PRC de algunos de los bloques de agarosa (no se muestran los datos) pusieron de manifiesto la presencia de cantidades significativas de ADN arqueal. Los experimentos de hibridación cuantitativa con ARNr extraído de una muestra, recogida a 200 metros de profundidad en la costa de Oregón, indicaron que la arquea planctónica de esta colonia contenía aproximadamente el 4,7% del total de biomasa planctónica (esta

5 muestra corresponde a "PAC1", -200 metros, de la tabla 1 de DeLong *et al.*, High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton, *Nature*, 371: 695-698, 1994). Los resultados de la amplificación por PCR del ADNr sesgado arquealmente realizada en los lisatos de los bloques de agarosa confirmó la presencia de cantidades relativamente grandes de ADN arqueal en esta muestra. Los bloques de agarosa preparados a partir de esta muestra de picoplankton

10 se seleccionaron para la posterior preparación de la genoteca de fósforos. Cada bloque de agarosa de 1 ml de este sitio contenía, aproximadamente, $7,5 \times 10^5$ células y, en consecuencia, la rodaja de 72 μl utilizada en la preparación del ADN parcialmente digerido presentaba, aproximadamente, $5,4 \times 10^5$ células.

Los brazos de los vectores se prepararon a partir de pFOS1 tal y como se describe (Kim *et al.*, Stable propagation of plasmid sized human ADN inserts in an F factor based vector, *Nucl. Acids Res.*, 20: 10.832-10.835, 1992). En resumen, 15 el plásmido se digirió por completo con AstII, desfosforiló con HK fosfatasa y, finalmente, se digirió con BamHI para generar dos brazos, cada uno de ellos con un centro cos en la orientación adecuada para clonar y empaquetar ADN ligado entre 35 y 45 kpb. El ADN de picoplankton parcialmente digerido se ligó durante toda la noche a los brazos pFOS1 en una reacción de ligación de 15 μl que contenía 25 ng de vector, 25 ng de inserto y 1 U de T4 DNA ligasa (Boehringer-Mannheim). El ADN ligado en cuatro microlitros de esta reacción se empaquetó *in vitro* con el 20 sistema de empaquetamiento Gigapack XL (Stratagene), las partículas de fósforos se transfecaron a la cepa de *E. coli* DH10B (BRL) y las células se extendieron sobre placas LB_{cm15}. Los clones fósforos resultantes se recogieron en el interior de bandejas de microvaloración con 96 pocillos que contenían LB_{cm13} complementada con glicerol al 7%. Los fósforos recombinantes, cada uno de los cuales contenía aproximadamente 40 kb de insertos de ADN de picoplankton, produjeron una genoteca de 3.552 clones fósforos, con un contenido aproximado de $1,4 \times 10^8$ pares de 25 bases de ADN clonado. Todos los clones analizados contenían insertos comprendidos en un intervalo de entre 38 y 42 kpb. Esta genoteca se almacenó congelada a -80°C para su análisis posterior.

Ejemplo 4

30 Valoración de la actividad enzimática

A continuación se recoge un ejemplo representativo de un procedimiento para cribar un genoteca de expresión preparada de conformidad con el ejemplo 2. En dicho ejemplo, los niveles de características químicas son los siguientes:

35 Nivel 1: Hidrolasa

Nivel 2: Amida, éster y acetal

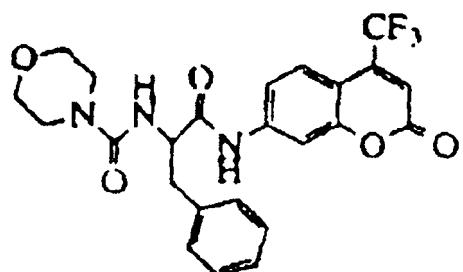
40 Nivel 3: Las divisiones y subdivisiones se basan en las diferencias entre cada uno de los sustratos que presentan un enlace covalente con la función del nivel 2 que experimentan la reacción así como en la especificidad del sustrato.

Nivel 4: Los dos posibles productos enantioméricos que la enzima puede generar a partir de un sustrato.

45 Aunque el ejemplo siguiente se dirige específicamente a los niveles antes mencionados, los procedimientos generales para someter a prueba a las diversas características químicas son, por lo general, aplicables a sustratos que no sean los que se citan en el presente ejemplo.

Cribado en busca de la hidrolasa del nivel 1 y la amida del nivel 2

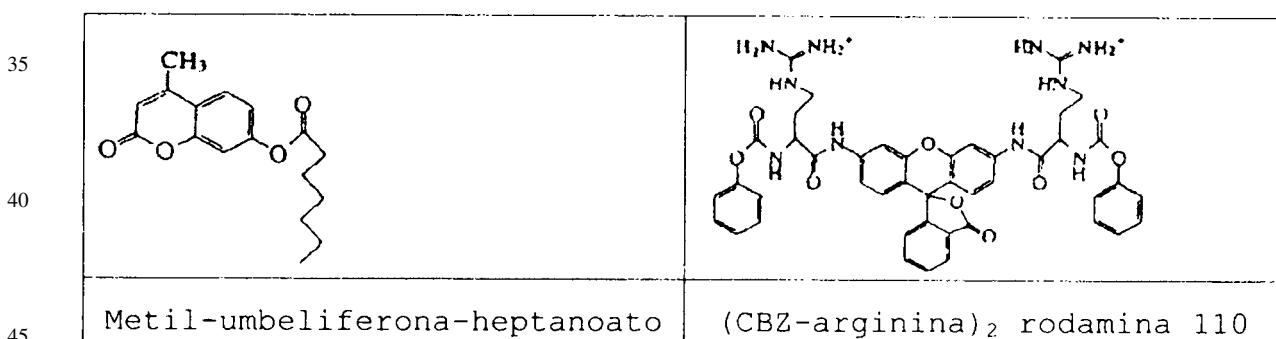
50 Las once placas de la genoteca de origen se utilizaron para inocular de forma múltiple una única placa (la "placa condensada") que contenía en cada pocillo 200 μl de LB ampicilina/meticilina y glicerol. Este paso se llevó a cabo con la herramienta de replicación de alta densidad del Beckman Biomek con un blanqueador al 1%, agua, isopropanol y un ciclo de esterilización por secado de aire entre cada inoculación. Así pues, cada pocillo de la placa condensada contenía 11 clones pBluescript distintos de cada una de las once placas de la genoteca de origen. La placa condensada se cultivó 55 durante 2 horas a 37°C y, luego, se utilizó para inocular dos placas blancas de microvaloración de segunda generación Dynatech de 96 pocillos, con 250 μl y LB ampicilina/meticilina y glicerol en cada pocillo. Las placas condensadas originales se incubaron a 37°C durante 18 horas y se almacenaron a -80°C. Las dos placas de segunda generación también se incubaron a 37°C durante 18 horas. Estas placas condensadas de segunda generación se calentaron a 70°C durante 45 minutos para destruir las células e inactivar las enzimas de *E. coli* de las células huésped. Una 60 solución madre de 5 mg/mL de morfourea fenilalanil-7-amino-4-trifluorometil-cumarina (MuFeAFC, el "sustrato") en DMSO se diluyó hasta 600 μM con tampón Hepes 50 mM de pH 7,5 que contenía 0,6 mg/mL de detergente dodecil maltósido.



MuFeAFC

15 Se añadieron 50 μ L de la solución de 600 μ M de MuFeAFC a cada uno de los pocillos de las placas blancas condensadas con un ciclo de mezcla de 100 μ L mediante el uso del Biomek para producir una concentración final de sustrato de -100 μ M. Se registraron los valores de fluorescencia (excitación = 400 nm, emisión = 505 nm) en un fluorímetro de lectura de placas inmediatamente después de la adición del sustrato ($t=0$). La placa se incubó a 70°C durante 100 minutos y, después, se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente durante otros 15 minutos. Los valores de fluorescencia se registraron nuevamente ($t=100$). Los valores con $t=0$ se restaron de los valores con $t=100$ para determinar la presencia de un clon activo.

Estos datos pusieron de manifiesto que uno de los once clones del pocillo G8 estaba hidrolizando el sustrato. Con la finalidad de determinar el clon específico responsable de esta actividad, las once placas de la genoteca de origen se descongelaron para utilizar cada uno de los clones para inocular por separado una nueva placa que contenía LB ampicilina/metilicilina y glicerol. Como en el procedimiento anterior, la placa se incubó a 37°C para diferenciar las células, calentadas a 70°C para inactivar las enzimas de las células huésped, y se añadieron 50 µL de los 600 µM de MuFeAFC mediante la utilización del Biomek. Además, se sometieron a prueba otros tres sustratos: el metil-umbelíferona-heptanoato, el derivado de rodamina CBZ-arginina y la caseína conjugada con fluoresceína (-3,2 moles de fluoresceína por mol de caseína).



La umbelifera y la rodamina se añadieron como soluciones madre de 600 μM en 50 μL de tampón Hepes. La caseína conjugada con fluoresceína también se añadió en 50 μL a una concentración madre de 20 y 200 mg/mL. Tras la adición de los sustratos, se registraron los valores de fluorescencia con $t=0$, la placa se incubó a 70°C y los valores con $t=100$ minutos se volvieron a registrar como ya se hizo con anterioridad.

Estos datos pusieron de manifiesto que el clon activo se encontraba en la placa 2. Esta actividad también metabolizó el derivado de rodamina arginina, pero el sustrato de la lipasa, el metil umbelifera heptanoato y la proteína, caseína conjugada con fluoresceína, no funcionaron como sustratos.

Partiendo de los datos anteriores, la clasificación de nivel 1 es “hidrolasa” y la clasificación de nivel 2 es el enlace amida. No existe reactividad cruzada con la clasificación de éster de nivel 2.

Como se muestra en la figura 2, un clon recombinante de la genoteca que se ha clasificado en el nivel 1 como hidrolasa y en el nivel 2 como amida se puede someter a prueba en el nivel 3 en busca de diversas especificidades. En la figura 2, las diversas clases del nivel 3 van seguidas de un código entre corchetes que identifica los sustratos de la tabla 1 que se utilizan para identificar las citadas especificidades del nivel 3.

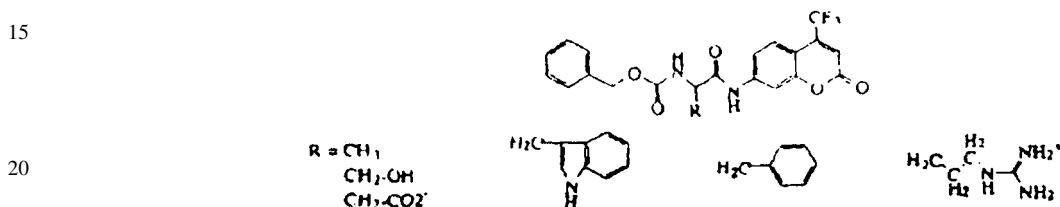
Como se puede apreciar en las figuras 3 y 4, un clon recombinante de la genoteca que se ha clasificado en el nivel 1 como hidrolasa y en el nivel 2 como éster se puede someter a prueba en el nivel 3 para determinar la existencia de diversas especificidades. En las figuras 3 y 4, las distintas clases del nivel 3 van seguidas de un código entre corchetes

ES 2 277 346 T3

que identifica los sustratos de la tabla 2 que se utilizan para identificar dichas especificidades del nivel 3. En las figuras 3 y 4, R₂ representa la parte de alcohol del éster y R₁ representa la parte de ácido de dicho éster.

- Como se muestra en la figura 5, un clon recombinante de la genoteca que se ha clasificado en el nivel 1 como hidrolasa y en el nivel 2 como acetal se puede someter a prueba en el nivel 3 en busca de diversas especificidades. En la figura 5, las distintas clases del nivel 3 van seguidas de un código entre corchetes que identifica los sustratos de la tabla 4 que se utilizan para identificar dichas especificidades del nivel 3.

- Las enzimas se pueden clasificar en el nivel 4 según la quiralidad del producto o productos generados por la enzima.
Por ejemplo, se pueden determinar aminoésteres quirales mediante la utilización de, como mínimo, los sustratos siguientes:



- Para cada sustrato metabolizado se determina el valor de enantioselectividad, E, según la ecuación siguiente:

$$E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}$$

- 35 donde ee_p = el exceso enantiomérico (ee) del producto hidrolizado y c = el porcentaje de conversión de la reacción. Consultese Wong y Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, 1994, Elsevier, Tarrytown, Nueva York, págs. 9-12.

- El exceso enantiomérico se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento quiral (CLAR) o bien mediante electroforesis capilar quiral (EC). Las valoraciones se llevan a cabo del modo siguiente: se añaden 200 μ L del tampón adecuado a cada pocillo de una placa blanca de microvaloración de 96 pocillos; después, 50 μ L de una solución enzimática parcial o completamente purificada; se añaden 50 μ L de sustrato y se realiza un seguimiento del incremento de la fluorescencia respecto al tiempo hasta que el 50% del sustrato se consume o bien se detiene la reacción, la circunstancia que se dé en primer lugar.

- 45 La enantioselectividad se determinó para una de las esterasas identificadas del modo siguiente. Para la reacción que forma (transesterificación) o degrada (hidrólisis) α -metil bencil acetato, la enantioselectividad de la enzima se obtuvo mediante la determinación de: ee_c (el exceso enantiomérico (ee) del sustrato sin reaccionar), ee_p (el ee del producto hidrolizado) y c (el porcentaje de conversión de la reacción). El exceso enantiomérico se determinó mediante cromatografía de gases de alto rendimiento quiral (CG). Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:
 50

Preparación de la muestra: las muestras se filtraron a través de un filtro de PTFE de $0.2 \mu\text{m}$ y 13 mm de diámetro.

- Column: Supelco β -DEX 120, 0.25 mm ID, 30 m, 0.25 μ m d_f.

Horno: 90°C durante un minuto y, luego, un incremento de 90°C hasta 150°C a razón de 5°C por minuto.

- Gas transportador: helio, 1 mL/min durante 2 minutos y, luego, un incremento de 1 mL/min hasta 3 mL/min a razón de 0,2 mL/min.

Detector: FID a 300°C

Inyección: 1 μ L (sustrato 1 mM en el disolvente de reacción), escisión (1:75), 200°C

- La reacción de transesterificación se llevó a cabo según el procedimiento descrito en *Organic solvent tolerance*. Véase el texto.

ES 2 277 346 T3

La transesterificación con la enzima ESL-001-01 proporcionó los resultados siguientes:

Disolvente	% ee _s	% ee _p	% C
N-heptano	10,9	44,3	19,8
Tolueno	3,2	100	3,1

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo del modo siguiente: se añadieron 50 μ L de una solución 10 mM de α -metil bencil acetato en DMSO acuoso al 10% (v/v) a 200 μ L de tampón fosfato 100 mM de pH 6,9. A esta solución se le añadieron 250 μ L de la enzima ESL-001-01 (2 mg/mL en tampón fosfato 100 mM de pH 6,9) y la reacción se calentó a 70°C durante 15 minutos. La reacción se estimuló según el procedimiento siguiente: extracción de 250 μ L de la mezcla de reacción de hidrólisis y colocación en un tubo Eppendorf de 1 mL. Adición de 250 μ L de acetato de etilo y agitación con fuerza durante 30 segundos. Separación de las fases durante 15 minutos. Extracción con una pipeta de 200 μ L de la capa superior de la fase orgánica y filtrado a través de un filtro de PTFE de 0,2 μ m y 4 mm de diámetro. Análisis mediante CG quiral como en el procedimiento anterior.

La hidrólisis con la enzima ESL-001-01 proporcionó los resultados siguientes:

% ee _s	% ee _p	% C
100	0,7	99,3

Ejemplo 5

Prueba en busca de características físicas de un clon recombinante

En el presente ejemplo se describen los procedimientos empleados para realizar pruebas en busca de una determinada característica física de una genoteca de clones recombinantes.

Óptimos de pH

Se añadieron 200 μ L de 4-metil-umbeliferilo-2,2-dimetil-4-pentenoato a cada pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos y se diluyó sucesivamente de la columna 1 a la columna 12. Se añadieron 50 μ L del tampón de pH 5X adecuado a cada fila de la placa de modo que se sometió a prueba la velocidad de reacción en ocho pH distintos en una única placa. Se añadieron 20 μ L de la enzima ESL-001-01 (dilución en una relación de 1:3.000 de una solución madre de 1 mg/mL) a cada pocillo para iniciar la reacción. Se realizó un seguimiento del incremento de la absorbencia a 370 nm y 70°C para determinar la velocidad de reacción: la velocidad frente a la concentración de sustrato se trasladó a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar la V_{máx} para cada pH.

La enzima ESL-001-01 proporcionó los resultados que se muestran en la figura 6.

Óptimos de temperatura

A una cubeta con termostato de 1 mL se añadieron 930 μ L de tampón Hepes 50 mM de pH 7,5. Tras el equilibrado térmico, se añadieron 50 μ L de la enzima ESL-001-01 (dilución en una relación de 1:8.000 de una solución madre de 1 mg/mL en tampón Hepes) y 20 μ L de 4-metil-umbeliferilo-heptanoato 5 mM que contenían 30 mg/mL de dodecil maltósido. La velocidad de incremento de absorbencia a 370 nm se cuantificó a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C.

La enzima ESL-001-01 proporcionó los resultados que se muestran en la figura 7.

Estabilidad térmica

Se incubaron muestras de 1 mL de la enzima ESL-001-01 (dilución en una relación de 1:4.000 de una solución madre de 1 mg/mL en tampón Hepes) a 70, 80 y 90°C. En puntos temporales determinados, se extrajeron alícuotas de 25 μ L y se valoraron con el procedimiento anterior en una placa de microvaloración de 96 pocillos con 200 μ L de 4-metilumbeliferilo palmitato 100 μ M y 0,6 mg/mL de dodecil maltósido. Estos datos se utilizaron para determinar la semivida para la inactivación de la enzima.

ES 2 277 346 T3

La enzima ESL-001-01 proporcionó los resultados siguientes:

Temperatura	Semivida
90	23 minutos
80	32 minutos
70	110 horas

15 *Tolerancia a disolventes orgánicos*

Disolventes hidromiscibles (dimetilsulfóxido (DMSO) y tetrahidrofurano (THF))

20 Se añadieron 30 μL de 4-metil-umbeliferilo-butirato 1 mM del disolvente orgánico a los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos. Se añadieron 240 μL de una mezcla de disolvente orgánico y tampón (véase la tabla siguiente) a los pocillos de la placa y, a continuación, 30 μL de una enzima ESL-001-01 (dilución en una relación de 1:50.000 de una solución madre de 1 mg/mL en tampón MOPS 50 mM de pH 6,9) y se incubó el conjunto a 70°C. Se realizó un seguimiento del incremento de fluorescencia (EX=360 nm, EM = 440 nm) respecto al tiempo para determinar las actividades relativas.

25

30 μL de disolvente orgánico	30 μL de tampón	% final de disolvente orgánico
240	0	90
195	45	75
150	90	60
120	120	50
90	150	40
60	180	30
30	210	20
0	240	10

La enzima ESL-001-01 OI proporcionó los resultados que se muestran en la figura 8.

55

*Disolventes no hidromiscibles (*n*-heptano, tolueno)*

Se añadió 1 mL del disolvente a un vial que contenía 1 mg de enzima liofilizada ESL-001-01 y una varilla de agitación. Se añadieron 10 μL de 1-fenetil alcohol 100 mM y 10 μL de acetato de vinilo 100 mM al vial, que se agitó en un bloque calentador a 70°C durante 24 horas. La muestra se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 μm y 4 mm de diámetro y se analizó mediante CG quiral como en el procedimiento anterior. Véase la sección anterior para conocer los datos.

60

Actividad específica

65

La actividad específica se determinó mediante 4-metil-umbeliferilo heptanoato 100 μM a 90°C en un tampón MOPS de pH 6,9. La actividad específica obtenida para la enzima ESL-001-01 fue de 1.662 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$.

ES 2 277 346 T3

Ejemplo 6

Prueba en busca de la especificidad del sustrato de un clon recombinante

5 En el presente ejemplo se describen los procedimientos para la realización de pruebas en busca de la especificidad del sustrato de un clon recombinante de una genoteca.

Identificación del sustrato

10 Se prepararon soluciones de un milimolar y un cuarto de milimolar que contenían 1 mg/mL de dodecil maltósido en tampón MOPS 50 mM de pH 6,9 de cada uno de los sustratos siguientes:

4-metil-umbeliferil acetato (A)

15 4-metil-umbeliferil propanoato (B)

4-metil-umbeliferil butirato (C)

20 4-metil-umbeliferil heptanoato (D)

4-metil-umbeliferil α -metil butirato (E)

25 4-metil-umbeliferil β -metilcrotonoato (F)

4-metil-umbeliferil 2,2-dimetil-4-pentenoato (G)

4-metil-umbeliferil monoéster de ácido adípico (H)

4-metil-umbeliferil 1,4-ciclohexano dicarboxilato (I)

30 4-metil-umbeliferil benzoato (M)

4-metil-umbeliferil p-trimetil cinamato de amonio (N)

35 4-metil-umbeliferil 4-guanidinobenzoato (O)

4-metil-umbeliferil α -metil fenil acetato (P)

40 4-metil-umbeliferil α -metoxi fenil acetato (Q)

4-metil-umbeliferil palmitato (S)

4-metil-umbeliferil estearato (T)

45 4-metil-umbeliferil oleato (U)

4-metil-umbeliferil elaidato (W).

Se añadieron 200 μ L de cada una de las soluciones anteriores a los pocillos de una placa de microvaloración de 50 96 pocillos, luego, 50 μ L de la enzima ESL-001-01 (dilución en una relación de 1:2,000 de una solución madre de 1 mg/mL en tampón MOPS); finalmente, el conjunto se incubó a 70°C durante 20 minutos. La fluorescencia (EX = 360 nm, EM = 440 nm) se cuantificó y se restó la fluorescencia causada por hidrólisis no enzimática. En la tabla 5 se muestra la fluorescencia relativa de cada uno de los sustratos anteriores.

55 El presente invento admite múltiples modificaciones y variaciones a la luz de los datos anteriores. En consecuencia, dentro del alcance que marcan las reivindicaciones, el invento se puede utilizar de otras formas a las descritas específicamente.

60

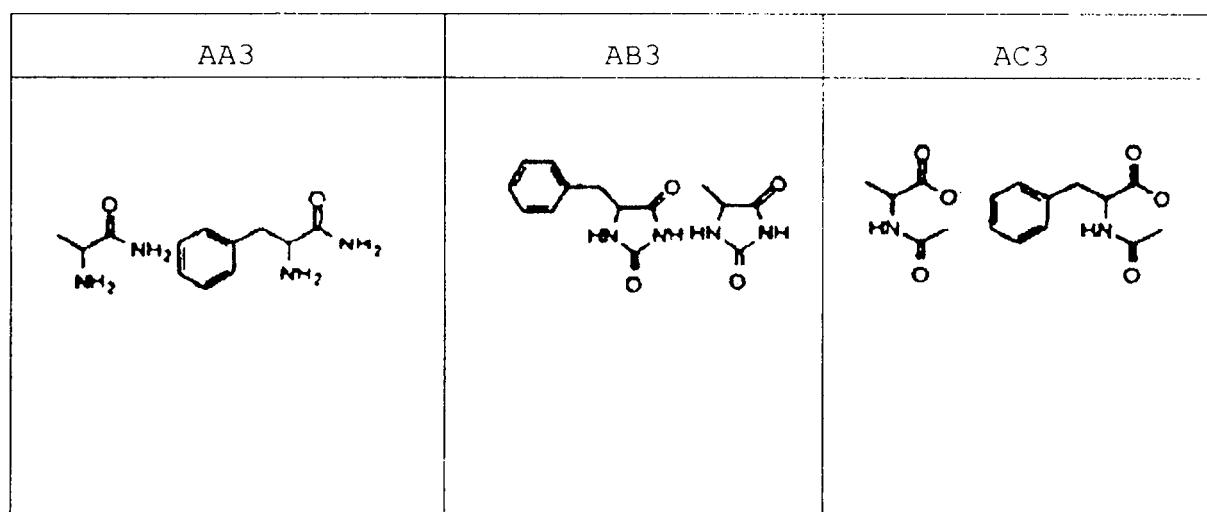
65

ES 2 277 346 T3

TABLA 1

A2

5 Caseína conjugada con fluoresceína (3,2 moles de fluoresceína/mol de caseína)
 CBZ-Ala-AMC
 t-BOC-Ala-Ala-Asp-AMC
 Succinil-Ala-Gli-Leu-AMC
 10 CBZ-Arg-AMC
 CBZ-Met-AMC
 Morfourea-Fe-AMC
 t-BOC = t-butoxi carbonil, CBZ = carbonil benciloxi
 15 AMC = 7-amino-4-metil cumarina



20
 AD3
 Caseína conjugada con fluoresceína
 t-BOC-Ala-Ala-Asp-AFC
 CBZ-Ala-Ala-Lis-AFC
 Succinil-Ala-Ala-Fe-AFC
 Succinil-Ala-Gli-Leu-AFC
 25 AFC = 7-amino-4-trifluorometil cumarina
 30
 35

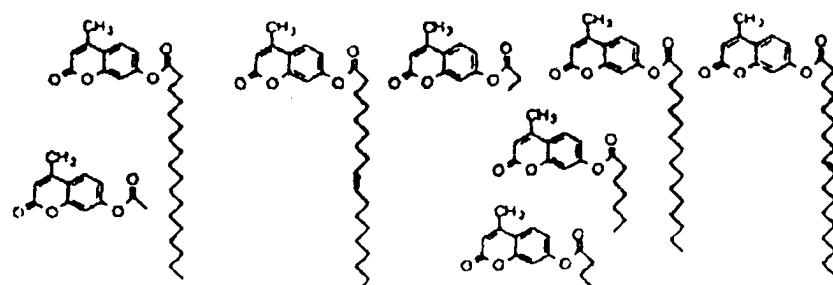
<p>40 AD3 Caseína conjugada con fluoresceína t-BOC-Ala-Ala-Asp-AFC CBZ-Ala-Ala-Lis-AFC Succinil-Ala-Ala-Fe-AFC Succinil-Ala-Gli-Leu-AFC 45 AFC = 7-amino-4-trifluorometil cumarina</p>	<p>AE3 Caseína conjugada con fluoresceína</p>	<p>AH3 Succinil-Ala-Ala-Fe-AFC CBZ-Fe-AFC CBZ-Trp-AFC</p>
<p>50 AF3 t-BOC-Ala-Ala-Asp-AFC CBZ-Asp-AFC</p>		

60
 65

	A13 Succinil-Ala-Gli-Leu-AFC CBZ-Ala-AFC CBZ-Sewr-AFC
5 10 15 20	AG3 CBZ-Ala-Ala-Lis-AFC CBZ-Arg-AFC

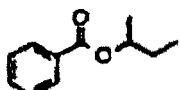
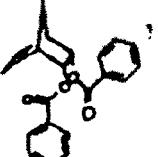
TABLA 2

L2

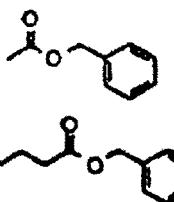
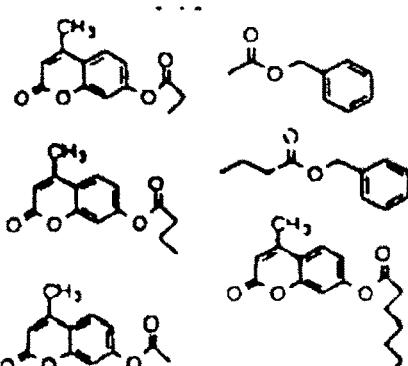
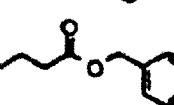
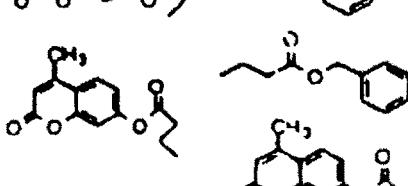
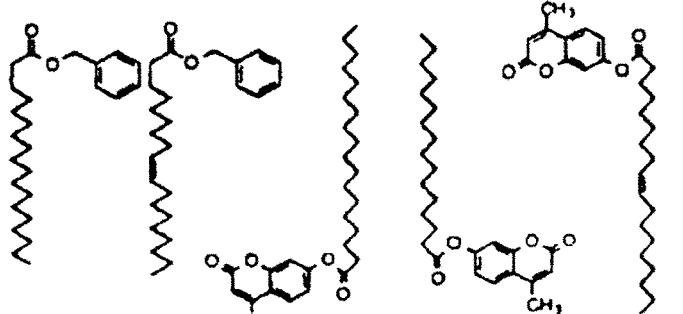
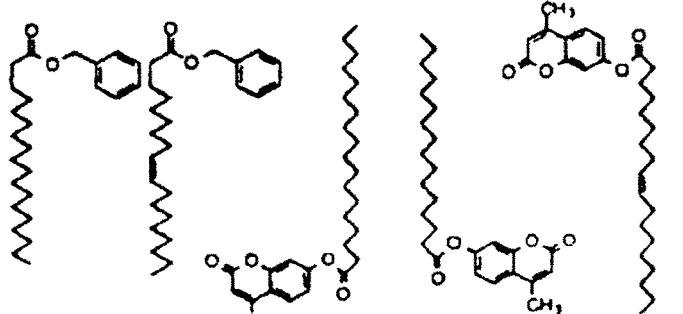


LA3	LB3
40 45 50	
55 60 65	LC3

ES 2 277 346 T3

LD3	LF3
5 	10 
15 	LG3
20 Y el conjunto de L2	cis

25 TABLA 3

LH3	LI3
30 	
35 	
40	
45 Y el conjunto de L2	
50 	
55	
60 	
65	

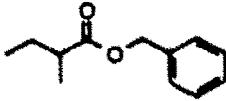
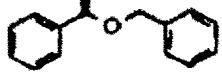
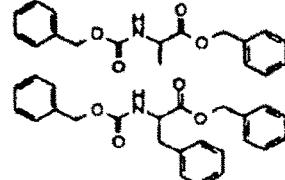
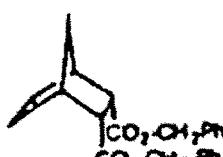
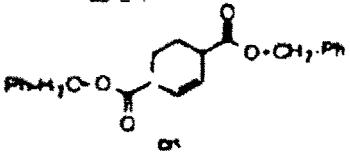
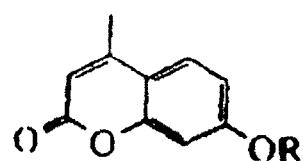
LK3	LM3	LL3
5 	10 	15 
20 	25 	

TABLA 4



4-metil-umbeliferona

donde R =

G2	β -D-galactosa
	β -D-glucosa
	β -D-glucurónido
GB3	β -D-celotriósido
	β -B-celobiopiranósido
GC3	β -D-galactosa
	α -D-galactosa
GD3	β -D-glucosa
	α -D-glucosa
GE3	β -D-glucurónido
GI3	β -D-N,N-diacetylquitobiosa

ES 2 277 346 T3

GJ3	β -D-fucosa
	α -L-fucosa
	β -L-fucosa
GK3	β -D-manosa
	α -D-manosa

Sustratos sin umbeliferilo

GA3	Damilasa [ligamientos α -1,4 poliglucano], amilopectina [ligamientos α -1,6 de ramificación de poliglucano]
GF3	Xilano [poli 1,4-D-xilano]
GG3	Amilopectina, pululano
GH3	Sacarosa, fructofuranósido

TABLA 5

COMPUESTO	FLUORESCENCIA RELATIVA
A	60,6
B	73,6
C	100,0
D	84,2
E	29,1
F	5,4
G	7,1
H	0,9
I	0,0
M	9,4
N	0,5
O	0,5
P	4,0

ES 2 277 346 T3

	Q	11, 3
5	S	0, 6
	T	0, 1
10	U	0, 3
	W	0, 2

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la obtención de una genoteca de enzimas recombinantes derivada de distintos organismos, que incluye: por un lado, el cribado de proteínas recombinantes producidas por múltiples clones de expresión, derivados de distintos microorganismos, cribado que se lleva a cabo para determinar los clones que producen enzimas recombinantes así como para determinar múltiples características enzimáticas distintas de las enzimas recombinantes; y, por otro lado, la clasificación de las enzimas recombinantes en función de las características enzimáticas para obtener la citada genoteca de enzimas recombinantes.

10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cribado incluye el cribado de las enzimas recombinantes en busca de una característica química y un nuevo cribado de las enzimas recombinantes que presentan la citada característica química en busca de una segunda característica de este tipo.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cribado incluye el cribado de las enzimas recombinantes en busca de una o varias oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

20 4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que dicho cribado incluye un nuevo cribado de las enzimas recombinantes en busca de una o varias funciones químicas específicas.

25 5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 4, en el que dicho cribado incluye el cribado de las enzimas recombinantes en busca de una o varias propiedades físicas.

30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a 5, que además incluye la identificación de los clones que producen las enzimas recombinantes.

35 7. El procedimiento de la reivindicación 6, que además incluye la secuenciación de los clones identificados para determinar la secuencia de ADN que contiene el código de la enzima.

40 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, en el que los microorganismos son microorganismos sin cultivar.

45 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, en el que los microorganismos se obtienen de una muestra ambiental.

50 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los microorganismos son extremófilos.

55 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que los extremófilos son termófilos, hipertermófilos, psicrófilos y psicrótrofos.

60 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 11, en el que la muestra ambiental se obtiene de hielo ártico y antártico, agua, permafrost, volcanes, tierra o especies vegetales de zonas tropicales.

45

50

55

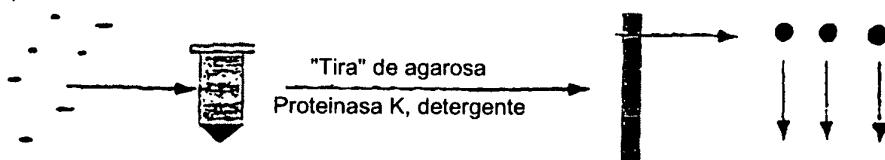
60

65

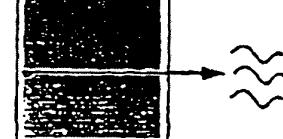
FIGURA 1

Creación de una genoteca ambiental en pFOS1

1. Concentración de las bacterias, digestión de las proteínas y conservación del ADN de elevado peso molecular.



2. Digestión parcial del ADN y selección de fragmentos de 40 kpb mediante PFGE o empaquetamiento λ -packaging (paso 3)



3. Ligación a los brazos fósforos, empaquetamiento y transfección a E. Coli
Disposición de la genoteca en placas de microvaloración

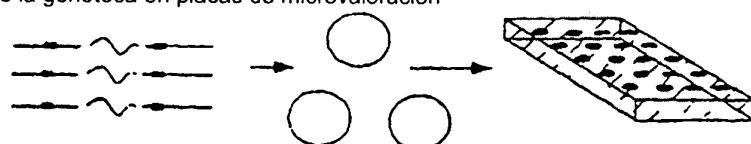


FIGURA 2

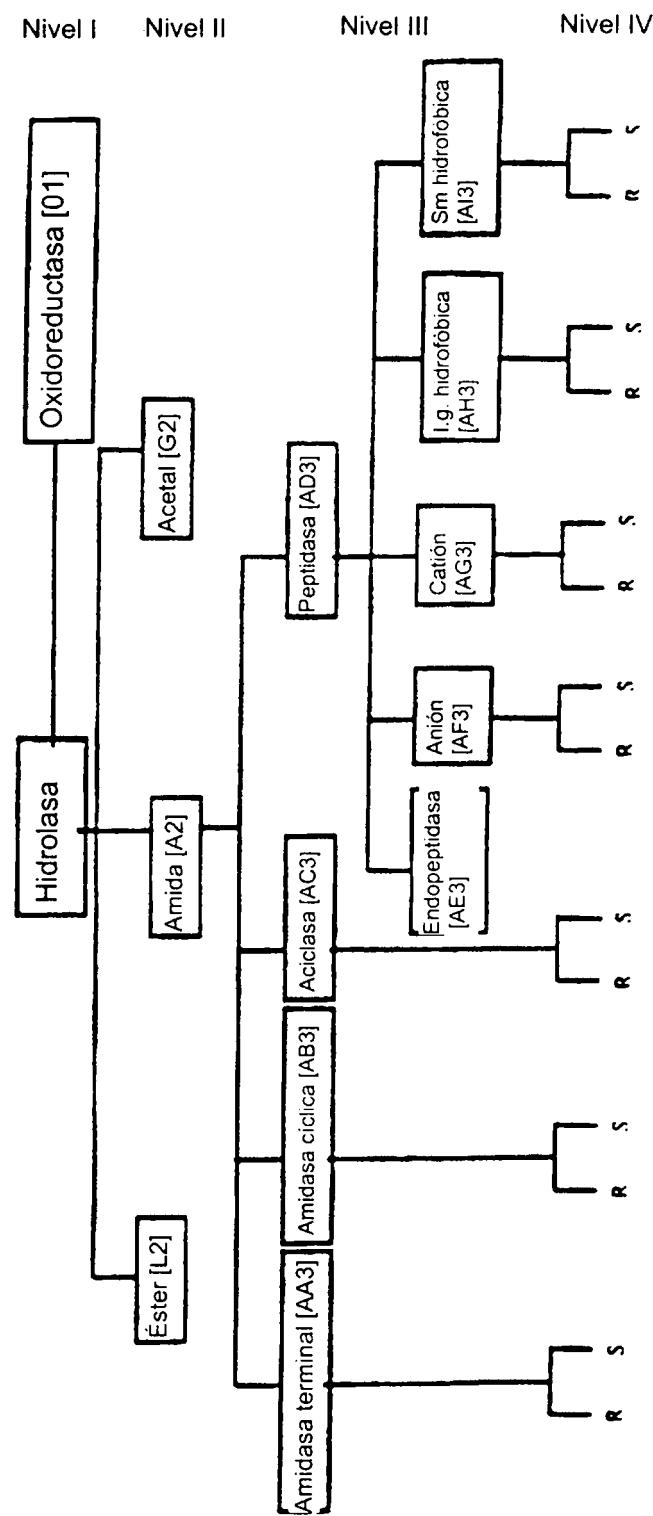


FIGURA 3

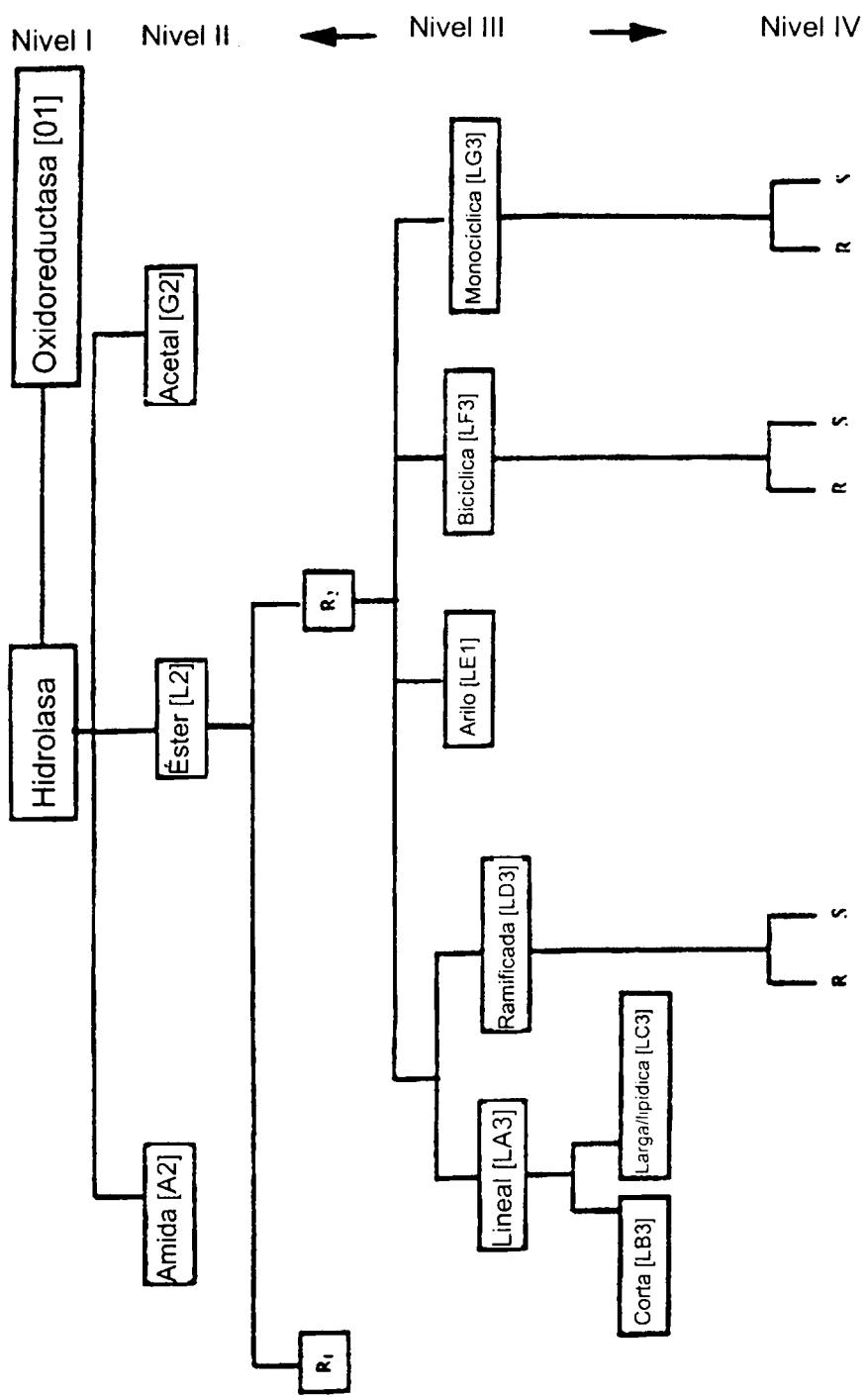


FIGURA 4

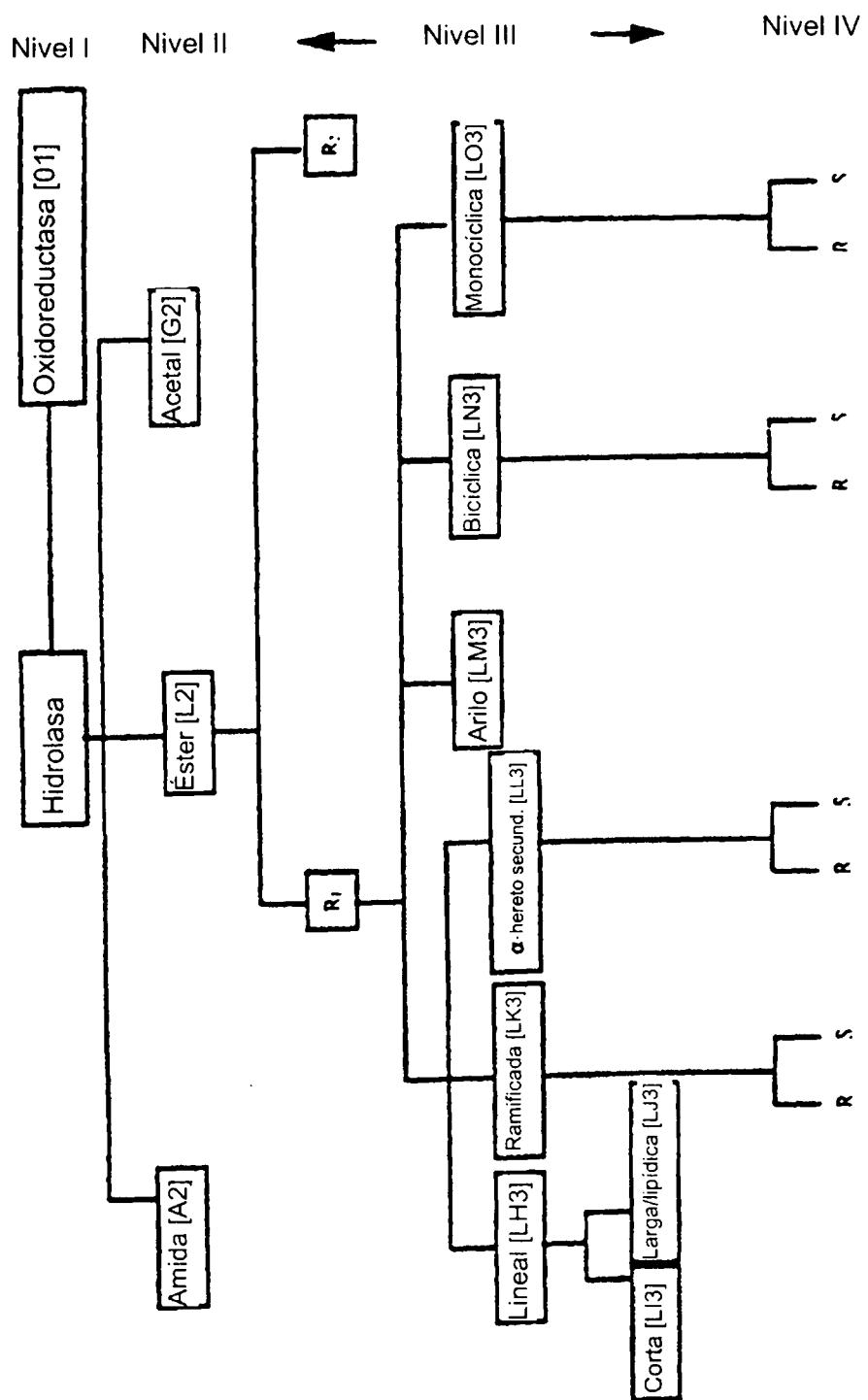
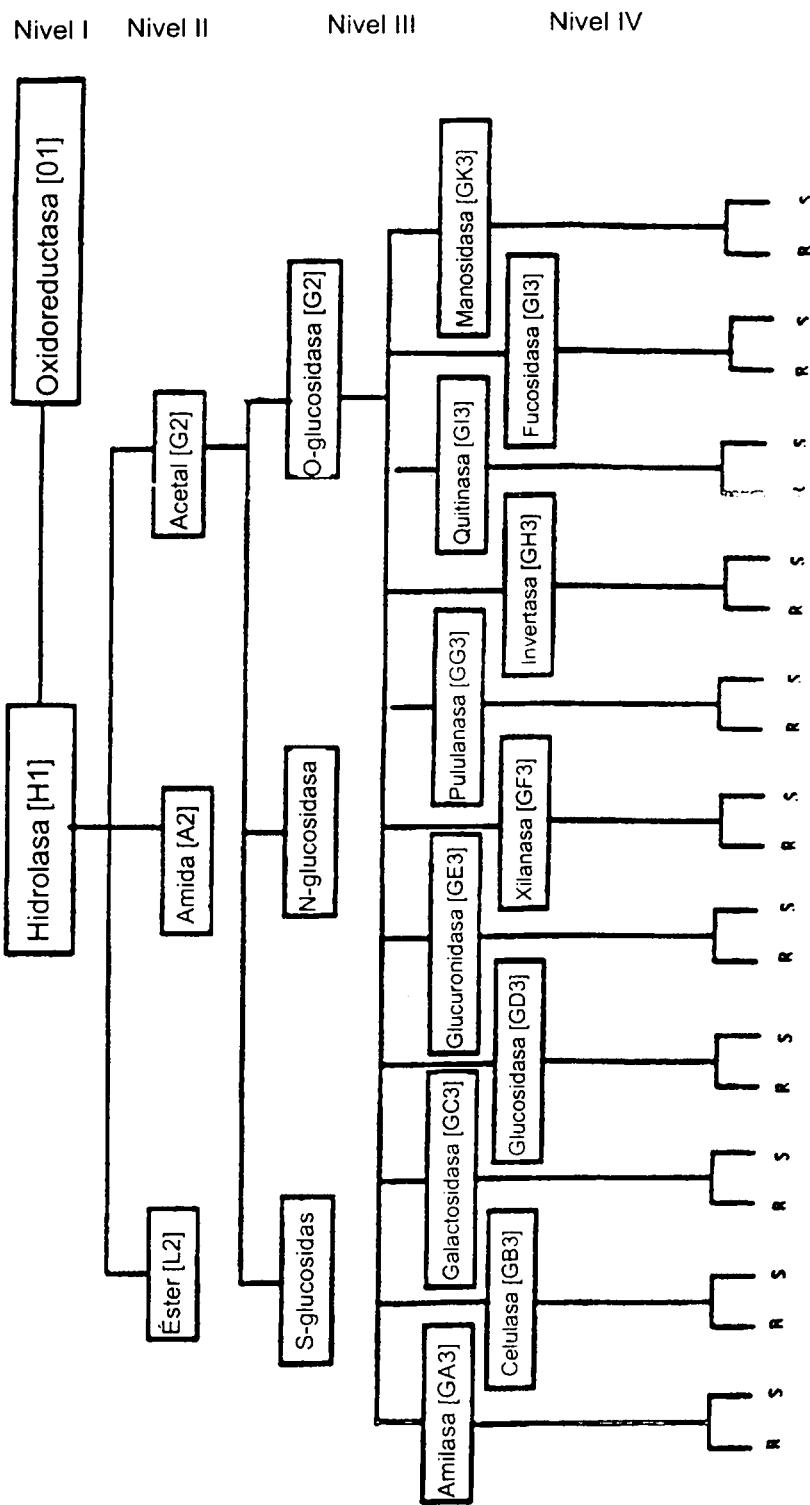


FIGURA 5



ES 2 277 346 T3

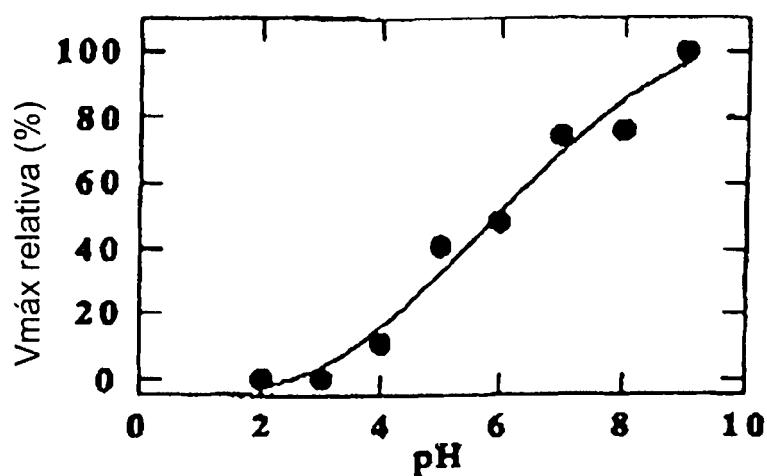


FIGURA 6

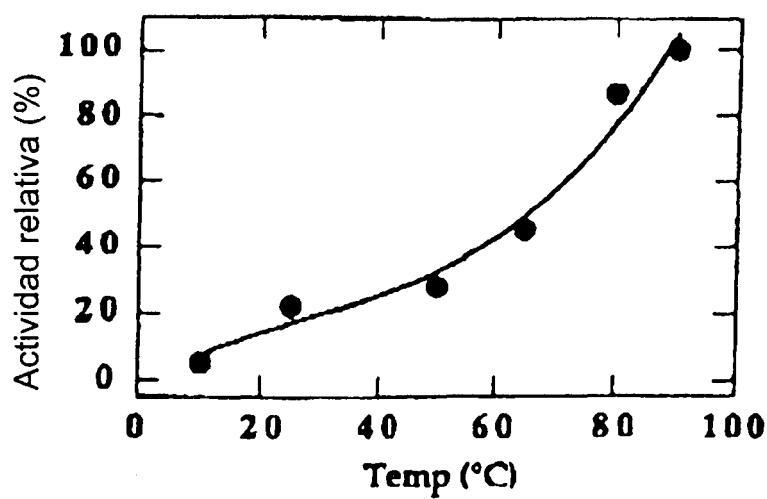


FIGURA 7

ES 2 277 346 T3

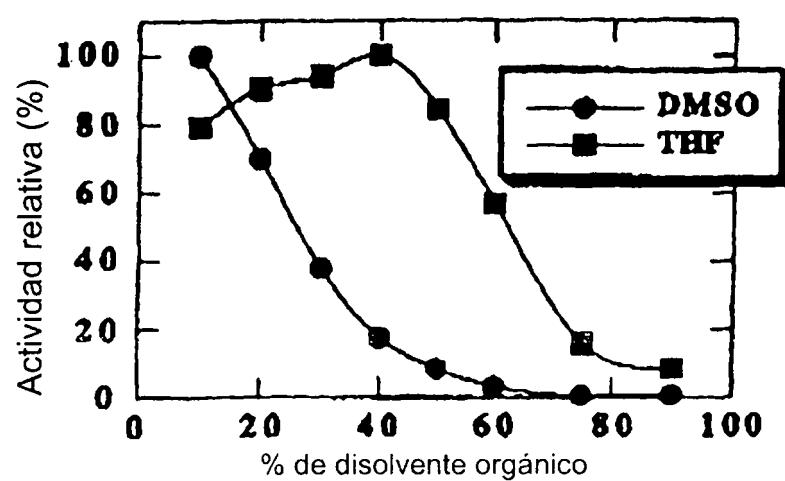


FIGURA 8