РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2012 110 039** (13) **A**

(51) МПК
C12N 15/63 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2012110039/10, 20.08.2010**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
20.08.2009 US 61/235,624

(43) Дата публикации заявки: **27.09.2013** Бюл. № **27**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **20.03.2012**

(86) Заявка PCT:
US 2010/046084 (20.08.2010)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2011/022590 (24.02.2011)

Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург а/я 5, ООО "Ляпунов и партнеры"

(71) Заявитель(и):
ИНТЕР АМЕРИКАН ЮНИВЕРСИТИ ОФ ПУЭРТО-РИКО (PR)

(72) Автор(ы):
РУИС Оскар (PR)

(54) СИСТЕМА РЕМЕДИАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

(57) Формула изобретения

1. Вектор для экспрессии гена хелатирования тяжелых металлов в бактериях, содержащий функционально связанные элементы:

каркас вектора,

последовательность транскрипционного конститутивного промотора, имеющую происхождение из пластидного гена 16S rrn,

последовательность трансляционного энхансерного элемента, имеющую происхождение из гена 10 бактериофага T7,

кодирующую последовательность хелатирующего агента, и

последовательность 3'UTR Rho-независимого транскрипционного терминатора,

причем вектор находится в бактерии, и бактерия содержит по меньшей мере примерно 6000 копий транскрипта кодирующей последовательности хелатирующего агента на нг суммарной мРНК в указанной бактерии.

2. Вектор по п.1, где 3'UTR терминатор представляет собой транскрипционный терминатор пластидного гена rps16 или транскрипционный терминатор гена rrnB E.coli.

3. Вектор по п.2, где 3'UTR терминатор представляет собой транскрипционный терминатор пластидного гена rps16.

4. Вектор по п.1, где хелатирующий агент кодируется геном mt, ppk или β-галактозидазы (lacZ).

5. Вектор по п.4, где хелатирующим агентом являются полифосфаты, синтезируемые

RU 2012110039 A

RU 2012110039 A

ppk, и бактерия устойчива к концентрациям ртути выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 100 мкМ, к концентрациям кадмия выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 250 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ или к концентрациям свинца выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

6. Вектор по п.4, где mt представляет собой металлотионеин млекопитающих.

7. Вектор по п.6, где хелатирующий агент кодируется последовательностью гена mt1 мыши, и бактерия устойчива к концентрациям ртути выше примерно 10 мкМ вплоть до примерно 100 мкМ, к концентрациям кадмия выше примерно 200 мкМ вплоть до примерно 250 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 500 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ или к концентрациям свинца выше примерно 250 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

8. Вектор по п.4, где хелатирующий агент кодируется последовательностью гена β-галактозидазы, и бактерия устойчива к концентрации вплоть до примерно 140 мкМ ртути, по меньшей мере примерно 250 мкМ кадмия, по меньшей мере примерно 1000 мкМ цинка или по меньшей мере примерно 3000 мкМ свинца.

9. Вектор по п.1, где каркас вектора представляет собой плазмидный каркас.

10. Бактерия, содержащая трансгенный хелатирующий агент, причем бактерия устойчива к концентрации по меньшей мере от примерно 20 мкМ до примерно 100 мкМ Hg.

11. Бактерия по п.10, где ген хелатирующего агента транскрибируется с сильного промотора и фланкирован выбранным 5'UTR и, необязательно, выбранными 3'UTR, так что по меньшей мере примерно от 4000 до 8500 копий стабильных транскриптов на нг суммарной мРНК соответствует гену хелатирующего агента.

12. Бактерия по п.11, где по меньшей мере от 6000 до 7500 копий стабильных транскриптов на нг суммарной мРНК соответствует гену хелатирующего агента.

13. Бактерия по п.11, где ген хелатирующего агента транскрибируется с последовательности транскрипционного конститутивного промотора, имеющей происхождение из пластидного гена 16S rrn.

14. Бактерия по п.11, где ген хелатирующего агента фланкирован последовательностью 5'UTR трансляционного энхансерного элемента, имеющей происхождение из гена 10 бактериофага T7, и последовательностью 3'UTR Rho-независимого транскрипционного терминатора пластидного гена rps16.

15. Бактерия по п.10, где ген хелатирующего агента транскрибируется с последовательности транскрипционного конститутивного промотора, имеющей происхождение из пластидного гена 16S rrn, и фланкирован последовательностью 5'UTR транскрипционного энхансерного элемента, имеющей происхождение из гена 10 бактериофага T7, и последовательностью 3'UTR Rho-независимого транскрипционного терминатора пластидного гена rps16.

16. Бактерия по п.10, где кодирующая последовательность хелатирующего агента соответствует гену mt1 мыши, и где бактерия устойчива к концентрации вплоть до примерно 160 мкМ ртути, к концентрациям кадмия выше примерно 200 мкМ вплоть до примерно 250 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 500 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ или к концентрациям свинца выше примерно 250 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

17. Бактерия по п.10, где кодирующая последовательность хелатирующего агента соответствует гену β-gal, и где бактерия устойчива к концентрации вплоть до примерно 140 мкМ ртути, по меньшей мере примерно 250 мкМ кадмия, по меньшей мере примерно 1000 мкМ цинка или по меньшей мере примерно 3000 мкМ свинца.

18. Бактерия по п.10, где кодирующая последовательность хелатирующего агента

RU 2012110039 A

RU 2012110039 A

соответствует гену ppk, и где бактерия устойчива к концентрациям ртути выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 100 мкМ, к концентрациям кадмия выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 250 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ, или к концентрациям свинца выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

19. Бактерия по п.10, которая, находясь в жидкой окружающей среде, содержащей ртуть, аккумулирует ртуть и приобретает темное окрашивание.

20. Бактерия по п.10, которая, находясь в жидкой окружающей среде, содержащей ртуть, кадмий, цинк или свинец, аккумулирует ртуть, кадмий, цинк или свинец и приобретает темное окрашивание.

21. Бактерия по п.10, выбранная из E.coli, Pseudomonas, Cyanobacteria и Bacillus.

22. Бактерия по п.10, которая, находясь в жидкой окружающей среде, содержащей ртуть, кадмий, цинк или свинец, аккумулирует ртуть, кадмий, цинк или свинец и образует агрегаты и осадки.

23. Бактерия по п.10, выращенная на биофильтре для подходящего обращения для удаления тяжелого металла из загрязненной жидкости.

24. Бактерия по п.10, где трансген хелатирующего агента представляет собой ген β-галактозидазы, и способность β-галактозидазы к расщеплению 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозида (X-gal) снижена из-за присутствия тяжелого металла.

25. Способ очистки жидкости от загрязнения ртутью, включающий:

добавление бактериальной культуры, экспрессирующей ген mt, ppk или β-галактозидазы, к жидкости, где бактерии в бактериальной культуре устойчивы к концентрации от примерно 20 мкМ Hg до по меньшей мере примерно 100 мкМ Hg, и

удаление бактерий из жидкости после периода времени, достаточного для секвестрации ртути.

26. Способ по п.25, где бактерии удаляют после того, как они образуют комки.

27. Способ по п.25, где агрегаты собирают путем аспирации, просеивания или удаления фильтра из очищаемой от загрязнения жидкости.

28. Способ по п.25, где бактерии экспрессируют β-галактозидазу, дополнительно включающий добавление X-gal по меньшей мере к одному образцу и тестирование этого образца для определения способности бактерий к метаболизму 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозида (X-gal) с получением синего окрашивания с целью определения концентрации ртути в образце.

29. Способ очистки жидкости от загрязнения ртутью, включающий:

помещение жидкости в устройство, содержащее твердый матрикс, где указанный матрикс дополнительно содержит β-галактозидазу без клеточного носителя; и

сбор жидкости, которая элюирует из твердого матрикса.

30. Набор для обнаружения загрязнения тяжелым металлом, содержащий:

бактериальную культуру, экспрессирующую β-галактозидазу, или фермент β-галактозидазу на индикаторной полоске, которая выявляет прогрессивное изменение цвета при воздействии различных концентраций ртути от примерно 5 мкМ до примерно 40 мкМ в растворах тяжелого металла в присутствии X-gal,

X-gal и

карту, показывающую окрашивание, соответствующее различным концентрациям тяжелого металла в жидкости при контакте с бактериальной культурой, экспрессирующей β-галактозидазу, или с ферментом β-галактозидазой на индикаторной полоске.

31. Набор по п.30, дополнительно содержащий колориметрический усилитель.

32. Набор для обнаружения загрязнения тяжелым металлом, содержащий:

контейнер для жидкостей,

RU 2012110039 A

RU 2012110039 A

бактериальную культуру, экспрессирующую β-галактозидазу, ppk или mt1, и

индикаторную полоску, показывающую темное окрашивание, соответствующее окрашиванию бактериальной культуры, экспрессирующей β-галактозидазу, ppk или mt1, при росте в присутствии различных концентраций тяжелых металлов от примерно 0 мкМ до 40 мкМ в жидкости.

33. Вектор по п.4, где хелатирующим агентом являются полифосфаты, синтезируемые ppk, и бактерия устойчива к концентрациям кадмия выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 250 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ или к концентрациям свинца выше примерно 20 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

34. Вектор по п.6, где хелатирующий агент кодируется последовательностью гена mt1 мыши, и бактерия устойчива к концентрациям ртути выше примерно 10 мкМ вплоть до примерно 100 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 500 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ или к концентрациям свинца выше примерно 250 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

35. Бактерия по п.11, где хелатирующий агент кодируется геном ppk, mt1 или β-gal, и бактерия устойчива к концентрациям ртути от примерно 20 мкМ вплоть до примерно 160 мкМ, к концентрациям кадмия выше примерно 200 мкМ вплоть до примерно 250 мкМ, к концентрациям цинка выше примерно 500 мкМ вплоть до примерно 1000 мкМ и к концентрациям свинца выше примерно 250 мкМ вплоть до примерно 3000 мкМ.

RU 2012110039 A

RU 2012110039 A