



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 792**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02721861 .9**

96 Fecha de presentación : **15.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1392825**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Fosfotriesterasa a partir del *Agrobacterium radiobacter* P230.**

30 Prioridad: **15.05.2001 AU PR5023**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.05.2011

73 Titular/es: **COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND
INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION
Limestone Avenue
Campbell, ACT 2601, AU**

72 Inventor/es: **Horne, Irene;
Sutherland, Tara;
Harcourt, Rebecca;
Russell, Robyn y
Oakeshott, John**

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

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

DESCRIPCIÓN

Fosfotriesterasa a partir del *agrobacterium radiobacter* p230

Campo de la invención:

- 5 Esta invención se relaciona con enzimas capaces de hidrolizar moléculas de organofosfato (OP). En particular, la invención se relaciona con una enzima fosfotriesterasa identificada a partir de una cepa *Agrobacterium radiobacter* aislada a partir del suelo que hidroliza los pesticidas OP, y el gen que codifica dicha enzima. También se describen en este documento los mutantes de la enzima fosfotriesterasa identificada, que han alterado la especificidad del sustrato.

Antecedentes de la invención:

- 10 Los residuos de los insecticidas organofosforados son contaminantes indeseables del ambiente y un rango de productos. Las áreas de particular sensibilidad incluyen contaminación de los suelos, irrigación de aguas abajo que se reciclan, utilizadas por irrigadores de corriente abajo o simplemente dejándolas correr fuera de la granja, y los residuos por encima de los niveles permisibles de las exportaciones agrícolas y hortícolas. El envenenamiento con organofosforados presenta un problema para los trabajadores agrícolas que se exponen a estos químicos, así como
- 15 personal militar expuesto a organofosforados utilizados en la guerra química. Adicionalmente, la acumulación de agentes nerviosos organofosforados se ha traducido en la necesidad de desintoxicar estas existencias. Por lo tanto se necesitan estrategias de bioremediación para eliminar o reducir estos residuos y/o existencias de organofosforados.

- Una estrategia propuesta involucra el uso de enzimas capaces de inmovilizar o degradar los residuos de organofosforados. Tales enzimas se pueden emplear, por ejemplo, en bioreactores a través de los cuales agua contaminada se podría pasar, o en soluciones de lavado después de la desinfección pos-cosecha de frutas, vegetales o productos de animales para reducir los niveles de residuos y los tiempos de retención. Las enzimas apropiadas para degradar los residuos de organofosforados incluyen hidrolasas de OP a partir de bacterias (Mulbry, 1992; Mulbry and Kearney, 1999; Cheng *et al.*, 1999; US 5,484,728; US 5,589,386), vertebrados (Wang *et al.*, 1993; 1998; Gan *et al.*, 1991; Broomfield *et al.*, 1999) e insectos resistentes a OP (WO 95/19440 y WO 97/19176). Es deseable que las hidrolasas de OP degraden los residuos de organofosforados a una velocidad rápida.
- 20
- 25

- La enzima degradante de OP más completamente estudiada es la dihidrolasa organofosfato (OPD) bacteriana, que se codifica por genes idénticos en diferentes plásmidos en tanto *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 y *Brevundimonas diminuta* MG (Harper *et al.*, 1988; Mulbry and Karns, 1989). La OPD es una proteína homodimérica que es capaz de hidrolizar un amplio rango de triésteres fosfato (tanto OPs oxon y tion) (Dumas *et al.*, 1989a, b). Su mecanismo de reacción directa o indirectamente involucra iones metálicos, preferiblemente Zn⁺⁺. La OPD no tiene actividad detectable con monoésteres o diésteres fosfato (Dumas *et al.*, 1989a, b; 1990).
- 30

- Los homólogos de OPD (proteínas que presentan homología con la fosfotriesterasa, o PHPs) han sido identificados en los genomas de *Escherichia coli* (ePHP), *Mycobacterium tuberculosis* (mtPHP) y *Mycoplasma pneumoniae* (mpPHP), aunque solo ePHP ha sido probada para la actividad fosfotriesterasa (Scanlan and Reid, 1995; Buchbinder *et al.*, 1998). No se detectó actividad en lisados crudos de ePHP con ninguno de los sustratos probados, tales como *p*-nitrofenil acetato, bis(*p*-nitrofenil) fosfato, paraoxon y *p*-nitrofenil fosfato.
- 35

- Los homólogos de OPD también han sido identificados en vertebrados (Davies *et al.*, 1997), aunque su función en estos organismos se desconoce. OPD, ePHP, mtPHP y PHPs de mamíferos son 27-30% idénticos en el nivel aminoácido, mientras que mpPHP es menos similar. Los residuos de aminoácidos involucrados en el enlace Zn⁺⁺ se conservan a través de los seis miembros de la familia fosfotriesterasa identificada hasta la fecha (Buchbinder *et al.*, 1998).
- 40

- Otras tres diferentes enzimas de hidrolización de OP, han sido aisladas a partir de bacterias con una historia de exposición a OPs (Mulbry and Karns, 1989; Mulbry, 1992; Cheng *et al.*, 1999). Las dos para las cuales los datos de secuencia están disponibles no se relacionan entre sí y con OPD. Una, una prolidasa a partir de *Alteromonas* sp., normalmente funciona en la hidrólisis de dipéptidos X-Pro. Su actividad para insecticidas OPs se reporta como modesta, aunque no ha sido reportada en términos de especificidad k_{cat}/K_m constante (Cheng *et al.*, 1999). La otra, una arildialquilfosfatasa (ADPasa) de la cepa de *Nocardia* sp. B-1, tiene un número de recambio para etil paratión que es 4500-veces inferior que aquel reportado para OPD (Mulbry and Karns, 1989; Mulbry, 1992).
- 45

- La paraoxonasa, o PON1, es una enzima diferente que hidroliza el OP encontrado en mamíferos. Como OPD es una metaloenzima, que prefiere Ca⁺⁺ en este caso, que se asocia con lipoproteínas de baja densidad en plasma y normalmente se involucra en el metabolismo de compuestos de lípidos oxidados (Gan *et al.*, 1991; Sorenson *et al.*, 1995). Esta tiene alta actividad para el paraoxon, con una especificidad constante de alrededor 10⁶ M⁻¹sec⁻¹ (Doorn *et al.*, 1999; Hong and Raushel, 1999).
- 50

Existe también evidencia de otras, enzimas así llamadas diisopropil fluorofosfatasa (DFPasa) en un amplio rango de vertebrados, invertebrados y microorganismos (Wang *et al.*, 1998; Hoskin *et al.*, 1999; Billecke *et al.*, 1999). Estas enzimas son notablemente diversas en muchas de sus propiedades bioquímicas pero todas se caracterizan por su actividad hidrolítica contra agentes OP de guerra química. Los limitados datos de secuencia sugieren que no se relacionan con todas las otras enzimas hidrolíticas de OP descritas anteriormente.

Moscardones y moscas domésticas resistentes a OP, han sido la fuente de enzimas esterasas con actividad contra OPs oxon como el clorfeninfos (CVP) y OPs carboxilester como malatión (Newcomb *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1998; Claudianos *et al.*, 1999; WO 95/19440; WO 97/19176). Un Gly para la sustitución de Asp en el residuo 137 en moscardón esterasa E3 (y su ortólogo de la mosca doméstica, ALI) da lugar a la adquisición de la actividad para CVP, mientras que un Trp para la mutación Leu/Ser en el residuo 251 en la misma enzima da lugar a actividad contra el malatión. Sin embargo, las constantes de especificidad de estas enzimas para sus sustratos OP tienen órdenes de magnitud menores que aquellas de OPD para el paraoxon.

Existe una necesidad de otra enzima que degrade los OPs, la cual se pueda utilizar en estrategias de bioremediación.

Resumen de la invención:

Los actuales inventores han desarrollado una prueba fluorométrica sensible y rápida para la hidrólisis del cumafos (un insecticida OP tion) y su uso para aislar una bacteria a partir de suelo contaminado que es capaz de utilizar OPs como la única fuente de fósforo. La secuenciación de ADNr 16S identificó la bacteria (aislado P230) como una cepa de *Agrobacterium radiobacter*. Los actuales inventores también han aislado y caracterizado la enzima responsable de esta actividad hidrolítica del cumafos y proporcionan los métodos para el uso de esta enzima en estrategias de bioremediación.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido purificado, el polipéptido que se selecciona de:

(i) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:2; o

(ii) un polipéptido que comprende una secuencia que es más del 95% idéntica a (i),

en donde el polipéptido es capaz de hidrolizar una molécula de organofosfato seleccionada del fosmet y el fentión.

En una modalidad preferida, el polipéptido es al menos 97% idéntica a (i), e incluso más preferiblemente al menos 99% idéntica a (i).

En una modalidad, el polipéptido de la invención se selecciona de:

(i) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:1;

(ii) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:3; o

(iii) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:4.

En una modalidad preferida, el polipéptido de la invención además es capaz de hidrolizar las moléculas de organofosfatos incluyendo, pero no limitando a, cumafos, coroxon, paraoxon, paratión, metil paratión, diazinon, clorpirifos, dMUP, DFP, dimetoato, malatión, y malaoxon.

En una modalidad preferida, el polipéptido se puede purificar a partir de un *Agrobacterium sp.*

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de fusión, que comprende un polipéptido de acuerdo con la presente invención fusionado a al menos otra secuencia de polipéptidos.

Preferiblemente, al menos otro polipéptido se selecciona del grupo que consiste de: un polipéptido que mejora la estabilidad del polipéptido de la invención, y un polipéptido que ayuda en la purificación del polipéptido de fusión.

Preferiblemente, al menos otro polipéptido es la proteína de enlace de maltosa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado, el polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de:

(i) una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:5;

(ii) una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:6;

(iii) una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:7;

(iv) una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:8;

(v) una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención; o

5 (vi) una secuencia que es al menos 90% idéntica a cualquiera de (i) a (v),

en donde el polinucleótido codifica un polipéptido capaz de hidrolizar una molécula de organofosfato seleccionada del fosmet y el fentión.

Preferiblemente, el polinucleótido es al menos 95% idéntico, más preferiblemente al menos 97% idéntico, e incluso más preferiblemente al menos 99% idéntico a cualquiera de (i) a (v).

10 En otro aspecto, se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, el vector es apropiado para la replicación y/o expresión de un polinucleótido. Los vectores pueden ser, por ejemplo, un plásmido, virus o vector de fago proporcionado con un origen de replicación, y preferiblemente un promotor para la expresión del polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. El vector puede 15 contener uno o más marcadores seleccionables, por ejemplo un gen resistente a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen resistente a la neomicina para un vector de expresión de un mamífero. El vector se puede utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizado para transfectar o transformar una célula huésped.

En otro aspecto, se proporciona una célula huésped no-humana que comprende un vector de acuerdo con la invención.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso de preparación de un polipéptido de la invención, el proceso que comprende el cultivo de una célula huésped de la invención bajo condiciones que permiten la producción del polipéptido, y la recuperación del polipéptido. Tales células se pueden utilizar para la producción de cantidades comercialmente útiles del polipéptido codificado.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para hidrolizar una molécula de organofosfato, la composición que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención, y uno o más portadores aceptables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para hidrolizar una molécula de organofosfato, la composición que comprende una célula huésped de la invención, y uno o más portadores aceptables.

30 Será apreciado que la presente invención se puede utilizar para hidrolizar los organofosfatos en una muestra. Por ejemplo, después de que un cultivo ha sido fumigado con un pesticida organofosfato, el residuo de organofosfato se puede hidrolizar de semillas, frutas y vegetales antes del consumo humano. De manera similar, el suelo o el agua contaminados con organofosfatos se pueden tratar con un polipéptido de la invención.

Por consiguiente, en otro aspecto la presente invención proporciona un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, el método que comprende la exposición de la muestra a un polipéptido de acuerdo con la invención.

35 Preferiblemente, el polipéptido se proporciona como una composición de la invención.

Adicionalmente, se prefiere que el método además comprenda la exposición de la muestra a un catión divalente. Preferiblemente, el catión divalente es el zinc.

40 Preferiblemente, la muestra se selecciona del grupo que consiste de; suelo, agua, material biológico, o una combinación de estos. Las muestras biológicas preferidas incluyen material derivado de plantas tales como semillas, vegetales o frutas, así como material derivado de animales tales como carne.

Las moléculas de organofosfatos preferidas incluyen, pero no se limitan a, cumafos, coroxon, paraoxon, paratión, metil paratión, fosmet, fentión, diazinon, clorpirifos, dMUP, DFP, dimetoato, malatión, y malaaxon.

Más preferiblemente, el organofosfato es el fosmet o el fentión.

- La muestra se puede exponer al polipéptido a través de cualquier vía disponible. Esta incluye proporcionando el polipéptido directamente a la muestra, con o sin portadores o excipientes etc. El polipéptido también se puede suministrar en la forma de una célula huésped, por lo general un microorganismo tal como una bacteria o un hongo, que expresa un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención. Usualmente, el polipéptido será suministrado como una composición de la invención.
- Las moléculas de organofosfatos en una muestra, también se pueden hidrolizar por la exposición de la muestra a una planta transgénica, la cual produce un polipéptido de la presente invención.
- De este modo, en otro aspecto se proporciona una planta transgénica que produce un polipéptido de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, método que comprende la exposición de la muestra a una planta transgénica de acuerdo con la invención.
- Preferiblemente, la muestra es el suelo.
- Además, se prefiere que el polipéptido al menos se produzca en las raíces de la planta transgénica.
- Sin embargo en otro aspecto, la presente invención proporciona una cepa aislada del *Agrobacterium radiobacter* depositada bajo NM01/21112 el 20 de Abril del 2001 en Laboratorios Analíticos del Gobierno Australiano.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para hidrolizar una molécula de organofosfato, composición que comprende la cepa del *Agrobacterium radiobacter* de la invención, y uno o más portadores aceptables.
- Sin embargo en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, método que comprende la exposición de la muestra a una cepa del *Agrobacterium radiobacter*, de acuerdo con la invención.
- La divulgación de la presente invención, se puede utilizar fácilmente para aislar otras cepas/especies bacterianas que hidrolicen los organofosfatos. Por ejemplo, otras cepas/especies bacterianas se pueden aislar utilizando un método de detección fluorométrica, según se revela en este documento. De manera alterna, las sondas y/o cebadores se pueden diseñar basándose en los polinucleótidos de la presente invención para identificar bacterias que producen las variantes de origen natural de los polipéptidos de la presente invención.
- Por consiguiente, también se describe en este documento una bacteria aislada, que produce un polipéptido de acuerdo con la invención.
- Preferiblemente, la bacteria es un *Agrobacterium sp.* Más preferiblemente, la bacteria es una cepa *Agrobacterium radiobacter*.
- También se describe en este documento, el uso de una bacteria de origen natural aislada, que produce un polipéptido de acuerdo con la invención para hidrolizar un organofosfato en una muestra.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una espuma o esponja polimérica para hidrolizar una molécula de organofosfato, la espuma o esponja que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención inmovilizado sobre un soporte poroso polimérico.
- Preferiblemente, el soporte poroso consiste de poliuretano.
- En una modalidad preferida, la esponja o espuma además comprende carbón incrustado o integrado sobre o en el soporte poroso.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, el método que comprende la exposición de la muestra a una esponja o espuma de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un biosensor para detectar la presencia de un organofosfato, el biosensor que comprende un polipéptido de la invención, y un medio para detectar la hidrólisis de una molécula de organofosfato por el polipéptido.

También se describe en este documento, un método para la detección de agentes que hidrolicen una molécula de organofosfato, el método que comprende

- (i) la exposición del organofosfato a un agente candidato, y
- (ii) la determinación de una señal fluorescente producida a partir de la etapa (i),

5 en donde la señal fluorescente es indicativo de la hidrólisis del organofosfato.

Preferiblemente, el organofosfato es el cumafos o el coroxon.

Además, se prefiere que el agente sea un polipéptido o un microorganismo.

El polipéptido de la presente invención se puede mutar, y los mutantes resultantes se seleccionan por la actividad alterada tal como cambios en la especificidad del sustrato.

10 Por lo tanto, también se describe en este documento, un método de producción de un polipéptido con habilidad mejorada para hidrolizar un organofosfato o especificidad alterada del sustrato para un organofosfato, el método que comprende

- i) mutación de uno o más aminoácidos de un primer polipéptido de acuerdo con la presente invención,
- ii) determinación de la habilidad del mutante para hidrolizar un organofosfato, y

15 iii) selección de un mutante con habilidad mejorada para hidrolizar el organofosfato o especificidad alterada del sustrato para el organofosfato, cuando se compara con el primer polipéptido.

Como se indica en la sección de Ejemplos, este método se ha aplicado con éxito para producir los polipéptidos proporcionados como SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.

Preferiblemente, el primer polipéptido se selecciona de cualquiera de SEQ ID NO's: 1 a 4.

20 También se describe en este documento, un polipéptido producido de acuerdo con el método anterior.

A lo largo de esta especificación la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento declarado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

25 La invención de ahora en adelante será descrita por medio de los siguientes Ejemplos y Figuras no limitantes.

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1: Estructura del cumafos y sus productos de hidrólisis.

Figura 2: La secuencia de ADN de opdA (SEQ ID NO:5). La región que codifica el dominio del péptido señal se indica en negrita, con la secuencia remanente que se refiere en este documento como SEQ ID NO:6.

30 Figura 3: Secuencia de aminoácidos de OpdA (SEQ ID NO:1). El péptido señal se indica en negrita.

Figura 4: Alineación de la secuencia de aminoácidos de OPD (SEQ ID NO:17) y OpdA. Las señales de secreción se indican en negrita.

Clave de la lista de secuencias:

SEQ ID NO: 1 - Secuencia del polipéptido de OpdA.

35 SEQ ID NO: 2 - Secuencia del polipéptido de OpdA menos la secuencia señal.

SEQ ID NO: 3 - Secuencia del polipéptido de OpdA1.

SEQ ID NO: 4 - Secuencia del polipéptido de OpdA2.

SEQ ID NO: 5 - Secuencia del polinucleótido que codifica OpdA.

SEQ ID NO: 6 - Secuencia del polinucleótido que codifica OpdA menos la secuencia señal.

SEQ ID NO: 7 - Secuencia del polinucleótido que codifica OpdA1.

SEQ ID NO: 8 - Secuencia del polinucleótido que codifica OpdA2.

5 SEQ ID NO's: 9 a 16 - cebadores de PCR.

SEQ ID NO: 17 - Secuencia del polipéptido de OPD a partir del *Flavobacterium sp.*

Descripción detallada de la invención:

Técnicas Generales

10 A menos que se indique de otra manera, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por aquellos de habilidad en el oficio. Tales técnicas se describen y explican en la literatura en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), y F.M. Ausubel et al. (Editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

Organofosfatos

20 Los organofosfatos son ésteres organofosforados sintéticos y compuestos relacionados tales como fosforoamidatos. Tienen la fórmula general $(RR'X)P=O$ o $(RR'X)P=S$, donde R y R' son grupos de cadena corta. Para los insecticidas organofosfatos X es un buen grupo saliente, el cual es un requisito para la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa.

Los polipéptidos de la presente invención hidrolizan los enlaces fosfoéster de los organofosfatos. Estos organofosfatos pueden ser, pero no se limitan a, OPs oxon y tion. El organofosfato puede tener grupo salientes aromáticos o alifáticos (X).

25 Aunque bien conocidos por su uso como pesticidas, los organofosfatos también han sido utilizados como gases nerviosos contra los mamíferos. Por consiguiente, se prevé que los polipéptidos de la presente invención también serán útiles para la hidrólisis de organofosfatos, los cuales no son pesticidas.

Polipéptidos

30 Por "polipéptido sustancialmente purificado" entendemos un polipéptido que generalmente ha sido separado de los lípidos, ácidos nucleicos, otros polipéptidos, y otras moléculas contaminantes con las cuales se asocia en su estado nativo. Preferiblemente, el polipéptido sustancialmente purificado es al menos 60% libre, más preferiblemente al menos 75% libre, y más preferiblemente al menos 90% libre de otros componentes con los cuales se asocian naturalmente.

35 El % de identidad de un polipéptido se determina por análisis FASTA (Pearson and Lipman, 1988) (programa GCG) utilizando la configuración predeterminada y una secuencia query de al menos 50 aminoácidos de longitud, y por medio de la cual el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 250 aminoácidos. Aún más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 350 aminoácidos.

40 Los mutantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención, se pueden preparar, mediante la introducción de cambios de los nucleótidos apropiados en una secuencia de ácido nucleico, o por síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Una combinación de delección, inserción y sustitución se puede hacer para llegar a la construcción final, siempre que el producto de la proteína final tenga las características deseadas. Ejemplos de mutantes de la presente invención se proporcionan en el Ejemplo 8.

En el diseño de mutantes de secuencias de aminoácidos, la ubicación del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerá de la(s) característica(s) que se modifica(n): Los sitios de mutación se pueden modificar de forma individual o en serie, por ejemplo, por (1) la sustitución primero con cambios de aminoácidos conservadores y luego con más selecciones radicales dependiendo de los resultados obtenidos, (2) delección del residuo diana, o (3) inserción de otros residuos adyacentes al sitio ubicado.

Las delecciones de la secuencia de aminoácidos por lo general oscilan de cerca de 1 a 30 residuos, más preferiblemente cerca de 1 a 10 residuos y por lo general cerca de 1 a 5 residuos contiguos.

Los mutantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de polipéptido retirado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de gran interés para la mutagénesis sustitucional incluyen sitios identificados como el o los sitios activos. Otros sitios de interés son aquellos en los cuales residuos particulares obtenidos de varias especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, especialmente aquellos que caen dentro de una secuencia de al menos tres otros sitios conservados idénticamente, preferiblemente se sustituyen de una manera relativamente conservadora. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1, bajo el título de "sustituciones ejemplares".

Puesto que la secuencia de SEQ ID NO:1 es 90% idéntica a aquella de la enzima OPD del *Flavobacterium*, es posible que la SEQ ID NO:1 pudiera ser utilizada para diseñar mutantes de la enzima OPD del *Flavobacterium*, los cuales tienen la actividad deseada pero son menos del 90% idénticos. Más específicamente, aquellos aminoácidos importantes para hidrolizar una molécula de organofosfato podrían ser cambiados para coincidir con los polipéptidos de la presente invención y otros aminoácidos que no afectan esta actividad también podrían ser cambiados para asegurar que los niveles de identidad no excedan el 90%. Ejemplos de tales mutantes de OPD incluyen los cambios de los aminoácidos L272F y/o H257Y. Dichos mutantes también se incluyen en la presente invención.

Tabla 1. Sustituciones ejemplares

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his;
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe;
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

Adicionalmente, si se desea, los aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos se pueden introducir como una sustitución o adición en el polipéptido de la presente invención. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil aminoácidos, $C\alpha$ -metil aminoácidos, $N\alpha$ -metil aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

También se incluyen dentro del alcance de la invención son polipéptidos de la presente invención que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo, por biotilación, bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por conocidos grupos protectores/bloqueo, división proteolítica, enlace con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden producir en una variedad de formas, incluyendo la producción y recuperación de proteínas naturales, producción y recuperación de proteínas recombinantes, y síntesis químicas de las proteínas. En una modalidad, un polipéptido aislado de la presente invención se produce por el cultivo de una célula capaz de expresar el polipéptido bajo condiciones efectivas para producir el polipéptido, y la recuperación del polipéptido. Las condiciones de cultivo efectivas incluyen, pero no se limitan a, medios efectivos, bioreactor, condiciones de temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el cual una célula se cultiva para producir un polipéptido de la presente invención. Tal medio por lo general comprende un medio acuoso que tiene fuentes de nitrógeno, fosfato y carbono asimilable, y sales, minerales, metales apropiados y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células de la presente invención se pueden cultivar en bioreactores de fermentación convencionales, matraces oscilantes, tubos de prueba, placas de microtitulación, y cajas de petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la habilidad de un experto en el oficio.

Polinucleótidos

Por "polinucleótido aislado" entendemos un polinucleótido, que por lo general ha sido separado de las secuencias del polinucleótido con las cuales se asocia o une en su estado nativo. Preferiblemente, el polinucleótido aislado es al menos 60% libre, más preferiblemente al menos 75% libre, y más preferiblemente al menos 90% libre de otros componentes con los cuales se asocian naturalmente. Adicionalmente, el término "polinucleótido" se utiliza indistintamente en este documento con el término "molécula de ácido nucleico".

Los polinucleótidos de la presente invención pueden tener una o más mutaciones cuando se compara con la SEQ ID NO's: 5 a 8. Estas mutaciones pueden ser delecciones, inserciones, o sustituciones de residuos de nucleótidos. Los mutantes pueden ser tanto de origen natural (es decir, aislados de una fuente natural) o sintético (por ejemplo, realizando mutagénesis de sitio dirigido sobre el ácido nucleico). Por lo tanto, es aparente que los polinucleótidos de la invención pueden ser tanto de origen natural como recombinante.

El % de identidad de un polinucleótido se determina por un análisis FASTA (Pearson and Lipman, 1988) (programa GCG) utilizando la configuración predeterminada y una secuencia query de al menos 150 nucleótidos de longitud, y por media de la cual el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 150 nucleótidos. Más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 300 nucleótidos. Aún más preferiblemente, el análisis FASTA alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 1050 nucleótidos.

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden ser ARN, ADN, o derivados de ambos. El tamaño mínimo de dichos oligonucleótidos es el tamaño necesario para la formación de un híbrido estable entre un oligonucleótido y una secuencia complementaria sobre una molécula de ácido nucleico de la presente invención. La presente invención incluye oligonucleótidos que se pueden utilizar como, por ejemplo, sondas para identificar moléculas de ácidos nucleicos o cebadores para producir las moléculas de ácidos nucleicos.

Los oligonucleótidos y/o polinucleótidos de la presente invención pueden hibridizar selectivamente a las secuencias establecidas en SEQ ID NO's: 5 a 8 bajo alta severidad. Como se utiliza en este documento, condiciones rigurosas son aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura de lavado, por ejemplo, NaCl 0.015 M/citrato de sodio 0.0015 M/0.1% de NaDodSO₄ a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, 50% (vol/vol) de formamida con 0.1% de albúmina de suero bovino, 0.1% de Ficoll, 0.1% de polivinilpirrolidona, solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 con NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 0.75M, citrato de sodio 0.075M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8), 0.1 % de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 g/ml), 0.1 % de SDS y 10% de dextran sulfato a 42°C en 0.2 x SSC y 0.1% de SDS.

Vectores

Una modalidad de la presente invención incluye un vector recombinante, que incluye al menos una molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención, insertada en cualquier vector capaz de entregar la molécula de ácido nucleico en una célula huésped. Dicho vector contiene secuencias heterólogas del ácido nucleico, es decir secuencias del ácido nucleico que no se encuentran naturalmente adyacentes a las moléculas del ácido nucleico de la presente invención y que preferiblemente se derivan de una especie diferente de la especie de la cual, la(s) molécula(s) del ácido nucleico se derivan. El vector puede ser cualquiera ARN o ADN, ya sea procariota o eucariota, y por lo general es un virus o un plásmido.

Un tipo de vector recombinante comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención ligada operativamente a un vector de expresión. La frase ligada operativamente se refiere a la inserción de una molécula de ácido nucleico en un vector de expresión de una manera tal, que la molécula es capaz de ser expresada cuando

se transforma en una célula huésped. Como se utiliza en este documento, un vector de expresión es un vector de ADN o ARN, que es capaz de transformar una célula huésped y efectuar la expresión de una molécula de ácido nucleico especificada. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicar dentro de la célula huésped. Los vectores de expresión pueden ser tanto procariotas como eucariotas, y por lo general son virus o plásmidos. Los vectores de expresión de la presente invención incluyen cualquiera de los vectores que puede funcionar (i.e., expresión directa del gen) en las células recombinantes de la presente invención, incluyendo en las células bacterianas, fúngicas, de endoparásitos, artrópodos, otras células animales, y vegetales. Los vectores de expresión preferidos de la presente invención pueden dirigir la expresión del gen en células bacterianas, de levaduras, vegetales y de mamífero.

Los vectores de expresión de la presente invención contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención. En particular, las moléculas recombinantes de la presente invención incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, elongación, y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Apropriadas secuencias de control de la transcripción incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células huésped de la presente invención. Una variedad de dichas secuencias de control de transcripción se conocen por aquellos de habilidad en el oficio. Las secuencias de control de la transcripción preferidas incluyen aquellas que funcionan en células bacterianas, de levadura, de vegetales y de mamífero, tales como, pero no limitando a, tac, lac, trp, trc, oxy-pro, omp/lpp, rrnB, bacteriófago lambda, bacteriófago T7, T7lac, bacteriófago T3, bacteriófago SP6, bacteriófago SP01, metalotioneína, factor de acoplamiento alfa, alcohol oxidasa *Pichia*, promotores subgenómicos alfavirus (tales como promotores subgenómicos virus Sindbis), gen de resistencia al antibiótico, baculovirus, virus de insecto *Heliothis zea*, virus de la vaccinia, virus del herpes, poxvirus del mapache, otros poxvirus, adenovirus, citomegalovirus (tales como promotores primarios intermedios), simian virus 40, retrovirus, actina, repetición terminal grande retroviral, virus Rous sarcoma, choque de calor, secuencias de control de la transcripción de fosfato y nitrato así como otras secuencias capaces de controlar la expresión del gen en células procariotas o eucariotas. Otras secuencias de control de la transcripción apropiadas incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido.

Las moléculas recombinantes de la presente invención también pueden (a) contener señales secretoras (i.e., secuencias de ácido nucleico segmento de señal) para permitir que un polipéptido expresado de la presente invención sea secretado de la célula que produce el polipéptido y/o (b) contener secuencias de fusión que conducen a la expresión de moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención como proteínas de fusión. Ejemplos de apropiados segmentos de señal incluyen cualquier segmento de señal capaz de dirigir la secreción de una proteína de la presente invención. Los segmentos de señales preferidos incluyen, pero no se limitan a, segmentos de señales de activador del tejido del plasminógeno (t-PA), interferón, interleucina, hormona de crecimiento, histocompatibilidad y glicoproteína de la cubierta vírica, así como secuencias de señales naturales. Además, una molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede unir a un segmento de fusión que dirige la proteína codificada con la proteosoma, tal como un segmento de fusión de ubiquitina. Las moléculas recombinantes también pueden incluir secuencias de intervención y/o no traducidas circundantes y/o dentro de las secuencias del ácido nucleico de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención.

Células Huésped

Otra modalidad de la presente invención incluye una célula recombinante que comprende una célula huésped no-humana transformada con una o más moléculas recombinantes de la presente invención. La transformación de una molécula de ácido nucleico en una célula se puede lograr por cualquier método por el cual una molécula de ácido nucleico puede ser insertada en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede permanecer unicelular o puede crecer en un tejido, un órgano o un organismo multicelular. Las moléculas de ácidos nucleicos transformadas de la presente invención pueden permanecer extracromosomales o pueden integrarse en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (i.e., recombinante) de tal manera que se conserva su capacidad de ser expresada.

Las células huésped apropiadas para transformar incluyen cualquier célula no-humana que puede ser transformada con un polinucleótido de la presente invención. Las células huésped pueden ser tanto células sin transformar como células que ya están transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas de la presente invención). Las células huésped de la presente invención pueden ser capaces de producir endógenamente (i.e., naturalmente) las proteínas de la presente invención o pueden ser capaces de producir las citadas proteínas después de ser transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Las células huésped de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína de la presente invención, e incluyen células bacterianas, fúngicas (incluyendo levadura), de parásitos, de artrópodos, de animales y vegetales. Las células huésped

preferidas incluyen células bacterianas, micobacterianas, de levadura, de vegetales y de mamífero no-humano. Las células huésped más preferidas incluyen células de *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Spodoptera*, *Mycobacteria*, *Trichoplusia*, BHK (riñón de crías de hámster), células MDCK (línea celular de riñón de perro normal para el cultivo del herpesvirus canino), células CRFK (línea celular de riñón de gato normal para el cultivo del herpesvirus felino), células CV-1 (línea celular de riñón de mono Africano utilizada, por ejemplo, para cultivar poxvirus de mapache), células COS (por ejemplo, COS-7), y células Vero. Las células huésped particularmente preferidas son *E. coli*, incluyendo derivados K-12 de *E. coli*; *Salmonella typhi*; *Salmonella typhimurium*, incluyendo cepas atenuadas; *Spodoptera frugiperda*; *Trichoplusia ni*; células BHK; células MDCK; células CRFK; células CV-1; células COS; células Vero; y células G8 del mioblasto de ratón no-tumorigénico (por ejemplo, ATCC CRL 1246). Otras células huésped de mamífero no-humano apropiadas incluyen otras líneas celulares de riñón no-humano, otras líneas celulares de fibroblasto no-humano (por ejemplo, líneas celulares de fibroblasto de embrión de gallina o murina), líneas celulares de mieloma no-humano, células de ovario de hámster Chino, células de NIH/3T3 de ratón y/o células de LMTK.

Las tecnologías de ADN recombinante se pueden utilizar para mejorar la expresión de moléculas de polinucleótidos transformadas por manipulación, por ejemplo, el número de copias de las moléculas del polinucleótido dentro de una célula huésped, la eficiencia con la cual las moléculas del polinucleótido se transcriben, la eficiencia con la cual las transcripciones resultantes se traducen, y la eficiencia de modificaciones post-traduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas del polinucleótido de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas del polinucleótido ligadas operativamente a plásmidos de alto número de copias, integración de las moléculas del polinucleótido en uno o más cromosomas de la célula huésped, adición de secuencias de estabilidad del vector para plásmidos, sustituciones o modificaciones de las señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotoras, operadoras, potenciadoras), sustituciones o modificaciones de la señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de enlace del ribosoma, secuencias Shine-Dalgarno), modificación de las moléculas del polinucleótido de la presente invención que corresponden al uso del codón de la célula huésped, y la delección de secuencias que desestabilizan las transcripciones. La actividad de una proteína recombinante expresada de la presente invención se puede mejorar por fragmentación, modificación, o derivatización de las moléculas del polinucleótido que codifica dicha proteína.

Plantas Transgénicas

Como generalmente se describe en WO 99/53037, los niveles de organofosfatos en una muestra se pueden reducir mediante la exposición de la muestra a una planta transgénica que expresa una enzima apropiada. Por lo general, la muestra es el suelo. Por consiguiente, el polinucleótido de la presente invención se puede expresar en una planta transgénica, particularmente las raíces de la planta, para hidrolizar las moléculas de organofosfatos en la muestra.

El término "planta" se refiere a plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo hojas, tallos raíces, etc), semillas, células vegetales y similares. Las plantas contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen tanto monocotiledones y dicotiledones. Los dicotiledones ejemplares incluyen algodón, maíz, tomate, tabaco, patata, judías, soja, y similares.

Las plantas transgénicas, tal como se definen en el contexto de la presente invención, incluyen plantas (así como partes y células de dichas plantas) y su progenie que ha sido modificada genéticamente utilizando técnicas de ADN recombinante para causar o mejorar la producción de al menos una proteína de la presente invención en la deseada planta u órgano de la planta.

El polipéptido de la presente invención se puede expresar constitutivamente en las plantas transgénicas durante todas las etapas de desarrollo. Dependiendo del uso de la planta o de los órganos de plantas, las proteínas se pueden expresar de una manera específica a la planta. Adicionalmente, dependiendo del uso, las proteínas se pueden expresar específicamente al tejido.

La elección de la especie de planta se determina por el uso previsto de la planta o partes de esta y la disponibilidad de la especie de planta para la transformación.

Las secuencias reguladoras que se conocen o se encuentran para originar la expresión de un gen que codifica una proteína de interés en las plantas, se pueden utilizar en la presente invención. La elección de las secuencias reguladoras utilizadas depende de la planta diana y/u órgano diana de interés. Tales secuencias reguladoras se pueden obtener de plantas o virus de plantas, o pueden ser sintetizadas químicamente. Dichas secuencias reguladoras son bien conocidas por aquellos de habilidad en el oficio.

Otras secuencias reguladoras, tales como secuencias de terminación y señales de poliadenilación incluyen cualquiera de dichas secuencias que funcionan como tal en las plantas, la elección de cuales sería evidente para el destinatario experto. Un ejemplo de tales secuencias es la región flanqueante 3' del gen nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Varias técnicas están disponibles para la introducción de la construcción de la expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés en las plantas diana. Tales técnicas incluyen pero no se limitan a transformación de protoplastos utilizando el método calcio/polietileno glicol, electroporación y microinyección o bombardeo de partículas (cubiertas). Además de los así llamados, métodos directos de transformación de ADN, los sistemas de transformación que involucran los vectores son ampliamente disponibles, tales como vectores virales y bacterianos (por ejemplo del género *Agrobacterium*). Después de la selección y/o detección, los protoplastos, células o partes de vegetales que han sido transformadas se pueden regenerar en plantas completas, utilizando métodos conocidos en el oficio. La elección de las técnicas de transformación y/o regeneración no es crítica para esta invención.

10 Composiciones

Las composiciones de la presente invención incluyen excipientes, también conocidos aquí como "portadores aceptables". Un excipiente puede ser cualquier material que los animales, plantas, material vegetal o animal, o ambiente (incluyendo muestras de suelo y agua) que se tratan, puedan tolerar. Ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente balanceadas. Los vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de ajonjolí, etil oleato, o triglicéridos también se pueden utilizar. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes que mejoran la viscosidad, tal como sodio carboximetilcelulosa, sorbitol, o dextran. Los excipientes también pueden contener menores cantidades de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Ejemplos de soluciones reguladoras incluyen solución reguladora de fosfato, solución reguladora bicarbonato y solución reguladora Tris, mientras que ejemplos de conservantes incluyen timerosal u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Los excipientes también se pueden utilizar para aumentar la vida media de una composición, por ejemplo, pero no se limitan a, vehículos poliméricos de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, otras células, aceites, ésteres, y glicoles.

Adicionalmente, el polipéptido de la presente invención se puede suministrar en una composición que mejore la velocidad y/o grado de hidrólisis del organofosfato, o aumente la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido se puede inmovilizar sobre una matriz de poliuretano (Gordon et al., 1999), o encapsular en liposomas apropiados (Petrikovics et al. 2000a y b). El polipéptido también se puede incorporar en una composición que comprende una espuma tal como aquellas utilizadas habitualmente en la lucha contra incendios (LeJeune et al., 1998). Como será apreciado por el destinatario experto, el polipéptido de la presente invención se podría utilizar fácilmente en una esponja o espuma como se revela en WO 00/64539.

Una modalidad de la presente invención es una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición de la presente invención en un material animal o vegetal, o el ambiente (incluyendo muestras de suelo y agua). Como se utiliza en este documento, una formulación de liberación controlada comprende una composición de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Apropiados vehículos de liberación controlada incluyen, pero no se limitan a, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones de bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de entrega transdérmicos. Las preferidas formulaciones de liberación controlada son biodegradables (i.e., bioerosionables).

Una formulación de liberación controlada de la presente invención preferida, es capaz de liberar una composición de la presente invención en suelo o agua que está en un área atomizada con un pesticida organofosfato. La formulación preferiblemente se libera durante un periodo de tiempo que oscila de aproximadamente 1 a cerca de 12 meses. Una formulación preferida de liberación controlada de la presente invención es capaz de realizar un tratamiento preferiblemente durante al menos aproximadamente 1 mes, más preferiblemente por al menos cerca de 3 meses, aún más preferiblemente por al menos cerca de 6 meses, aún más preferiblemente por al menos cerca de 9 meses, e incluso más preferiblemente por al menos cerca de 12 meses.

La concentración del polipéptido, vector, o célula huésped de la presente invención que será necesaria para producir efectivas composiciones para hidrolizar un organofosfato dependerá de la naturaleza de la muestra que se descontamina, la concentración del organofosfato en la muestra, y la formulación de la composición. La concentración efectiva del polipéptido, vector, o célula huésped dentro de la composición se puede determinar fácilmente de forma experimental, como será entendido por un experto.

Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que por lo general consisten de un material biológicamente activo tal como una enzima y un transductor que convierte una reacción bioquímica en una señal electrónica cuantificable que se puede procesar, transmitir, y medir. Una revisión general de biosensores que han sido utilizados para la detección de compuestos organofosforados se proporciona por Rekha et al. (2000). El polipéptido de la presente invención se puede adaptar para su uso en tales biosensores.

Ejemplos

Ejemplo 1- Enriquecimiento de muestras de suelo para microorganismos con actividad hidrolítica del cumafos

Prueba fluorométrica para la hidrólisis del cumafos

- 5 Las enzimas fosfotriestearasas catalizan la división de un enlace fosfoéster en moléculas de organofosfato (OP) para producir un fosfodiéster y un alcohol. En el caso del cumafos (3-cloro-4-metil-7-coumarinil dietil fosforotioato), la hidrólisis de la fosfotriesterasa produce dietiltiofosfato y el alcohol fluorescente, clorferon (3-cloro-7-hidroxi-4-metil cumarina; Figura 1). La hidrólisis del cumafos, por lo tanto se puede medir fluorimétricamente por la producción del clorferon, según se mide por excitación a una longitud de onda de 355 nm y una intensidad de emisión de 460 nm.
- 10 La fluorescencia del clorferon fue lineal en el rango de 0.01 µM a 2.5 µM.

- Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron en un fluorómetro POLARstar (BMG Technologies Pty Ltd, Australia) utilizando placas de microtitulación de 96 pozos (placas FluoroNunc con superficie PolySorp, Nalge Nunc International) y volúmenes de reacción final de 100 µl. Soluciones stock de cumafos y clorferon (0.4 mM), se prepararon en 20% de metanol. Los ensayos crudos de células completas se realizaron en cumafos 100 µM, 0.5% de Triton X-100 y Tris-HCl 50 mM, pH8.0. Los ensayos hidrolíticos de cumafos de lisados celulares se realizaron sin el Triton X-100.
- 15

La fluorescencia de colonias bacterianas y geles de poliacrilamida teñidos, fue analizada utilizando una luz UV de longitud de onda grande portátil (aproximadamente 340 nm) (Gelman Sciences).

Enriquecimiento de cultivos

- 20 Los productos fosfodiéster de hidrólisis de las fosfotriesterasas se pueden utilizar como fuentes de fósforo mediante un amplio rango de bacteria (Cook *et al.*, 1978; Rosenberg and Alexander, 1979). Un enriquecimiento del cultivo por consiguiente fue establecido, en el cual 1 g de suelo obtenido de una yarda doméstica, que previamente ha sido expuesto a diazinon (un dietil tion OP), sirvió como un inóculo para 50 ml de medio enriquecido (Tabla 2), en el cual el cumafos fue la única fuente de fósforo adicionada.

25 **Tabla 2. Composición de medio enriquecido con cumafos.**

Medio (por litro)		Solución de elementos trazas (por litro)	
Tris	6.05 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	20 mg
NH ₄ Cl	1 g	H ₃ BO ₃	50 mg
FeCl ₂	20 mg	ZnCl ₂	30 mg
KCl	0.5 g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	3 mg
Acetato de sodio	0.68 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
MgSO ₄	0.1 g	Acetato cúprico	10 mg
p-aminobenzoato	0.9 mg		
Ácido nicotínico	0.9 mg		
Solución de elementos trazas	10 ml		
Cumafos	100 mM		
pH 7.0			

Diez por ciento del enriquecimiento del cultivo fue subcultivado dos veces en 50 ml de medio enriquecido fresco que contiene cumafos como la única fuente de fósforo. A continuación, el cumafos fue reemplazado con diazinon (a 100

mM) en el medio enriquecido y el cultivo subcultivado como antes. Después de 3 días de incubación a 28°C, el enriquecimiento del cultivo además fue subcultivado en medios en los cuales, paratión 100mM (otro OP dietil tion) fue la única fuente de fósforo. Se observó que después de dos días, el cultivo se había vuelto de color amarillo (probablemente debido a la producción de *p*-nitrofenol). Este cultivo luego fue diluido en medio libre de fósforo y se sembró en placas sobre placas de LB bajo en sal (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 2.5 g/l de NaCl). Después de tres días de crecimiento a 28°C, aproximadamente 100 colonias fueron recogidas aleatoriamente, se volvieron a sembrar para asegurar la pureza y luego se analizaron para la actividad hidrolítica del cumafos utilizando la prueba de placa de microtitulación descrita anteriormente. La fluorescencia fue medida después de 8 horas a temperatura ambiente. Una aislado (designado P230) demostró significativa fluorescencia y este aislado fue analizado otra vez. Las colonias de este aislado también demostraron fluorescencia sobre una placa de agar que contiene cumafos.

Ejemplo 2 - Identificación del aislado P230

El aislado P230 fue una bacteria Gram negativa, catalasa positiva y oxidasa positiva, en forma de vara. Para determinar la identidad del aislado P230, se llevó a cabo el análisis de secuencia del gen de ARN 16S. El ADN fue extraído de un aislado P230 de acuerdo con el método de Rainey *et al.* (1992). Las células de un cultivo de P230 que han sido cultivadas en medio LB bajo en sal (2 ml) durante la noche a 28°C, fueron peletizadas por centrifugación en una microcentrífuga (12 000 rpm/2 minutos). El pellet celular fue resuspendido en 400 µl de solución reguladora STE (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH8.0) y se adicionaron 5 µl de una solución de lisozima recién preparada (0.3 µg/ml). Después de la incubación a 37°C durante 20 minutos, se adicionaron la Proteinasa K (15 µl de una solución al 1%) y SDS (10 µl de una solución al 25%) y las reacciones se incubaron a 60°C durante 30 minutos. Las preparaciones de ADN luego se extrajeron de forma secuencial con un volumen igual de solución reguladora-fenol saturada, y luego un volumen igual de cloroformo.

El gen de ARN 16S fue amplificado a partir del ADN extraído por PCR, utilizando los cebadores universales bacterianos 27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') (SEQ ID NO: 9) y 1492r (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (SEQ ID NO: 10), los nombres de los cuales se basan en el sistema de numeración del gen *E. coli* de ARN 16S (Lane, 1991). Aproximadamente 1320 bp del gen de ARN 16S a partir del aislado P230, fue obtenido y las similitudes de secuencia se realizaron utilizando el algoritmo FASTA (Pearson and Lipman, 1988). El gen de ARN 16S del aislado P230 fue muy similar en secuencia con la de otras cepas *Agrobacterium* (Tabla 3).

Tabla 3. Comparaciones de la secuencia del ácido nucleico de los genes de ARN 16S del aislado P230 con aquellos de varias cepas de *Agrobacterium*.

Cepas de <i>Agrobacterium</i>	Identidad de la Secuencia (%)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> LMG383	100
<i>Agrobacterium</i> sp LMG11936	99.7
<i>Agrobacterium</i> sp. MSMC211	99.5
<i>Agrobacterium</i> sp. LMG11915	99.3

Estos resultados sugieren que el aislado P230 fue una cepa *Agrobacterium*. El uso de fuentes de carbono por el aislado P230 fue analizado utilizando el sistema Biolog (Oxoid), de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. El perfil del uso del carbono luego, fue comparado con el de la conocida especie de *Agrobacterium* (Tabla 4; Krieg and Holt, 1984). El aislado fue capaz de utilizar sacarosa, ornitina y glucosa como fuentes de carbono. Esto, junto con una reacción de oxidasa positiva determinada utilizando el método de Kovac (Kovac, 1956), sugiere que el aislado fue más similar a cualquiera *A. tumefaciens* biovar1 o *A. radiobacter* biovar1.

Tabla 4. Perfiles del uso del Carbono y estado de oxidasa del aislado P230 y la conocida especie de *Agrobacterium*.

Prueba/Fuente Carbono	<i>Agrobacterium</i> spp.						
	A. <i>Tumefaciens</i> biovar2	A. <i>Tumefaciens</i> biovar1	A. <i>Radiobacter</i> biovar1	A. <i>Radiobacter</i> biovar2	A. <i>Rhizogenes</i> biovar2	A. rubi	P230 Aislado
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	-	+	-	-	-	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Prueba Oxidasa (Kovac)	+	-	+	-	-	-	+

A. tumefaciens biovar1 y *A. radiobacter* biovar1 se pueden distinguir por la presencia de un plásmido que induce el tumor en el formador. La capacidad de inducir el tumor de la cepa P230 fue probada en un semillero de tomate, mediante la transferencia de una suspensión densa de bacterias en agua a las hojas y utilizando una aguja estéril para perforar la superficie de las hojas a través de la suspensión. No hay evidencia de que fueran vistos tumores después de un periodo de cuatro semanas. *A. tumefaciens* C58 fue utilizado como un control positivo y produjo tumores en este periodo de tiempo. Una cepa curada de *A. tumefaciens* C58 fue utilizada como un control negativo y produjo los mismos efectos en el vegetal de prueba que el aislado P230. Por consiguiente el aislado P230 fue designado como una cepa de *Agrobacterium radiobacter* biovar1.

Ejemplo 3 - Expresión constitutiva de la actividad hidrolítica del cumafos

Con el fin de determinar si la actividad de la fosfotriesterasa de *A. radiobacter* P230 se expresó constitutivamente, independientemente de la presencia de OPs, las actividades hidrolíticas del paratión de cultivos de *A. radiobacter* P230 fueron examinadas en la presencia y ausencia del paratión (Tabla 5). El crecimiento fue monitoreado, mediante la determinación de la densidad óptica de los cultivos a 595 nm en un espectrofotómetro microplate BioRad Model 3550-UV. La actividad hidrolítica del paratión fue analizada de acuerdo con el procedimiento de Serdar *et al.* (1989). Esto involucra la determinación de la formación de *p*-nitrofenol a partir del paratión a 405 nm en un espectrofotómetro microplate BioRad Model 3550-UV. La mezcla de reacción contenía paratión 880 µM en Tris-HCl 50 mM pH8.0 (esta reacción también contenía 5% de metanol). La Tabla 5 muestra que la actividad hidrolítica del paratión se expresó constitutivamente en el aislado P230 y que la mayoría de esta actividad fue expresada en fase log temprana a media.

Ejemplo 4 - Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo (PAGE) de extractos de P230

Para demostrar que una única enzima se involucró en la hidrólisis del cumafos, geles nativos de extractos de células de P230 de *A. radiobacter* fueron teñidos para la actividad hidrolítica del cumafos. Un cultivo (50 ml) de P230 de *A. radiobacter* en caldo LB bajo en sal fue peletizado por centrifugación a 8000 durante 15 minutos y el pellet celular se volvió a suspender en 2 ml de Tris-HCl 50 mM pH8.0. Las células se rompieron por sonicación (cinco impactos de 15 segundos a 4°C) y grandes restos de células o células intactas se retiraron por centrifugación (8000 g durante 15 minutos). Una alícuota del sobrenadante resultante (que contiene 5 µg de proteína) a continuación, fue separada en un gel SDS-PAGE al 10% (29:1 acrilamida:bis). Antes de la carga, ni el SDS ni el β-mercaptoetanol se adicionaron a la muestra y adicionalmente, la muestra no se dejó hervir como en el SDS-PAGE convencional. Después de la electroforesis, el gel se equilibró durante 5 min en Tris-HCl 50 mM pH8.0, y luego se incubó por otros 5 min en Tris-HCl 50 mM pH8.0, que contiene cumafos 8µM. El gel luego fue examinado bajo luz UV, como se describe anteriormente. Una banda fluorescente importante se detectó, indicando que el aislado P230 contiene una única enzima con actividad hidrolítica del cumafos. Esta enzima tuvo una masa molecular aparente de 66 kDa.

Tabla 5. Actividades hidrolíticas del paratión de cultivos de P230 cosechados en la presencia o ausencia de paratión para una OD a 595 nm de 0.280.

Cultivo	Actividad hidrolítica del paratión ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de la proteína)
+ paratión	3.36 $\pm$ 0.18
- paratión	3.13 $\pm$ 0.07

Ejemplo 5 – Clonación del gen responsable de la actividad hidrolítica del cumafos

5 Técnicas de clonación y Preparaciones de ADN

Las técnicas de clonación generales, a menos que se indique lo contrario, fueron estándar y según se describe por Sambrook *et al.* (1989). El ADN cromosomal fue extraído a partir de P230 de *A. radiobacter* de acuerdo con el método de Gardiner *et al.* (1996). En resumen, un cultivo durante la noche (100 ml) de *A. radiobacter* P230 fue peletizado por centrifugación a 5000 g durante 20 minutos, se lavó dos veces con 10 ml de solución reguladora STE congelada (ver anteriormente), y finalmente se volvió a suspender en 10 ml de STE. La lisozima (20 mg) se adicionó y las células incubadas por 2 horas a 37°C. Un volumen igual de STE, se adicionó junto con SDS (a una concentración final de 2% [peso/ vol]) y RNasa (a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el lisado celular se incubó a 42°C durante 1 hora. La proteinasa K (concentración final 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) luego se adicionó y el lisado se incubó a 55°C hasta que la solución se hace translúcida. Un volumen igual de solución reguladora-fenol saturada/cloroformo (1:1) se adicionó, la muestra se mezcló completamente y luego se centrifugó a 5000 g durante 1 hora a 4°C. La capa acuosa superior fue transferida a un tubo limpio utilizando una pipeta rota con el fin de prevenir la cizalla del ADN. Para precipitar el ADN cromosomal, se adicionaron acetato de sodio 3M, pH 5.2, (volumen 0.1) y etanol congelado (volúmenes 2.5), la solución se mezcló suavemente y se colocó a - 20°C durante 1 hora. El ADN luego fue retirado utilizando una pipeta Pasteur "gancho". Este precipitado se lavó con 70% de etanol y se secó al aire durante 5 minutos. Se adicionó solución reguladora TE (pH 8.0; 1 ml) y el ADN se dejó disolver a 4°C durante la noche.

Construcción de la biblioteca en *E. coli*

Un *Sau3AI* parcial digerido de ADN cromosomal de *A. radiobacter* P230 fue preparado por la digestión de 37.5 μg de ADN con 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 unidades de endonucleasa de restricción *Sau3AI* por 10 minutos a 37°C. Los fragmentos de ADN en el rango de tamaño de 10-12 kb fueron retirados por escisión a partir de un gel de agarosa al 0.7% y se extrajeron utilizando un kit de extracción de gel/purificación PCR QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. pBluescript KS+ ADN de plásmido (Stratagene), se preparó utilizando el kit Geneworks Ultraclean Plasmid miniprep, fue digerido con *Bam*HI durante 1 hora a 37°C y se desfosforiló utilizando fosfatasa alcalina intestinal de becerro (Boehringer Mannheim). La fosfatasa luego fue retirada utilizando el kit de purificación PCR QIAquick (QIAGEN). Los fragmentos de ADN de P230 fraccionados por tamaño se unieron con el *Bam*HI digerido, vector pBluescript tratado con fosfatasa, utilizando ligasa de ADN T4 y la solución reguladora de ligasa T4 proporcionada por New England Biolabs. Las uniones se realizaron durante 20 horas a 4°C.

El ADN ligado luego fue transformado en DH10 β de *E. coli* utilizando el método revisado de transformación de Hanahan (Sambrook *et al.*, 1989). La mezcla de transformación se sembró en placas de agar LB que contiene ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosida; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosida; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se incubó a 37°C durante la noche. Aproximadamente 350 colonias blancas se revelaron.

Los acoplamiento de triparentales para la expresión en *A. tumefaciens*

Dado que era posible que el gen que codifica la actividad hidrolítica de OP en *A. radiobacter* no sería expresado suficientemente en *E. coli*, para permitir la identificación en la base de la expresión, los plásmidos pBluescript a partir de la biblioteca *E. coli* anteriormente se transformaron en una cepa relacionada estrechamente, *A. tumefaciens* C58. *A. tumefaciens* C58 es una cepa de *Agrobacterium* que hidroliza no-OP (Zimmerer *et al.*, 1966). En resumen, las colonias blancas identificadas anteriormente sobre placas LB que contiene ampicilina, X-Gal e IPTG fueron parchados sobre las placas LB, sin ningún tipo de adiciones. También fueron parchados sobre las mismas placas en los mismos lugares *A. tumefaciens* C58 y *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), que contienen el plásmido conjugativo, cointegrativo, pR751::Tn813 (Bowen and Pemberton, 1985). Se pretendía que el plásmido conjugativo, cointegrativo pasaría a *E. coli* DH10 β que contiene los derivados de pBluescript y forma un cointegrado. Los cointegrados luego serían transformados en *A. tumefaciens* C58.

Los acoplamiento de triparentales se incubaron durante la noche a 28°C. Las mezclas de acoplamiento a continuación se rasparon y se analizaron para la actividad hidrolítica del cumafos en una placa de microtitulación.

Esto involucra la resuspensión de la mezcla de acoplamiento en una solución reguladora de prueba que contiene 0.5% de Triton X-100, cumafos 100 μ M y Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Las placas de microtitulación luego se incubaron por 8 horas a temperatura ambiente, y la cantidad de fluorescencia fue observada como se describe anteriormente. Una mezcla de acoplamiento (que contiene el clon p65) demostró significativa fluorescencia.

5 **Actividad hidrolítica del cumafos de extractos libres de células DH10 β p65 *E. coli***

Los extractos libres de células de *E. coli* DH10 β p65, y extractos control que contienen el vector pBluescript solo, se prepararon a partir de las células cultivadas a la fase log media en medio LB que contiene ampicilina (100 μ g/ml). El cultivo de 50 ml fue peletizado por centrifugación a 8000 g durante 15 minutos y se volvió a suspender en 2 ml Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Las células se rompieron por sonicación (cinco impactos de 15 segundos a 4°C) y restos grandes de células o células intactas fueron retiradas por centrifugación (8000 g por 15 minutos). Las alícuotas (que contienen 15 mg de proteína) de los sobrenadantes se analizaron para la actividad hidrolítica del cumafos. El aumento en fluorescencia se midió a través del tiempo y la cantidad de actividad determinada. Se puede ver en la Tabla 6, que los extractos libres de células de *E. coli* DH10 β que contienen el clon p65 mostró significativa actividad hidrolítica del cumafos en comparación con la de los controles de un solo vector.

15 **Localización del gen que codifica la actividad hidrolítica de OP en el clon p65**

El ADN del clon p65 fue digerido a finalización con *Hind*III y se separaron los cuatro fragmentos resultantes [5.5 kb (que contienen el vector pBluescript), 4 kb, 3.5 kb y 1.4 kb] y posteriormente se tomaron por escisión a partir de un gel al 1% de agarosa. Los fragmentos se extrajeron utilizando el kit de purificación QIAquick PCR (QIAGEN) y se unieron con un ADN pBluescript digerido *Hind*III preparado como se describe anteriormente. Las mezclas de unión se transformaron en *E. coli* DH10 β y los clones individuales se analizaron para la actividad hidrolítica del cumafos. Varios de los clones que contienen el fragmento *Hind*III de 4 kb demostraron actividad hidrolítica del cumafos, dependiendo de la orientación del fragmento en pBluescript en relación con el promotor lac.

Tabla 6. Actividad hidrolítica del cumafos de extractos libres de células de *E. coli* DH10 β p65 y extractos control que contienen solo el vector pBluescript.

Cepa	Actividad hidrolítica del cumafos (nmol/min/mg de proteína)
<i>E. coli</i> DH10 β (pBluescript)	0.78 $\pm$ 0.04
<i>E. coli</i> DH10 β (p65)	3.30 $\pm$ 0.07

Ejemplo 6 - Secuencia de *opdA*

La secuencia del nucleótido del fragmento *Hind*III de 4 kb identificada anteriormente se determinó utilizando cebadores complementarios a los promotores T3 y T7 en el vector y "cebador walking". El ADN fue secuenciado utilizando el sistema Terminador BigDye (Applied BioSystems) sobre el Applied BioSystems ABI PRISM 377 secuenciador de ADN automatizado. Un marco de lectura abierto (ORF) fue identificado en la misma orientación como el promotor *lacZ* en los clones que poseen actividad y en la orientación opuesta en los clones que carecen de actividad. El marco de lectura abierto contiene 1152 nucleótidos (Figura 2) y, cuando se traduce, codificaría una proteína de 384 aminoácidos (Figura 3) y 41.4 kDa.

Las similitudes de la secuencia se calcularon utilizando el algoritmo FASTA (Pearson and Lipman, 1988). Esto indica que el ORF tuvo 88% de la secuencia del nucleótido identidad a *opd*, un gen de fosfotriesterasa identificado previamente a partir de *Flavobacterium* sp. ATCC27551 (Mulbry and Karns, 1989). Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos presumida del ORF fue 90% idéntica a aquella de la enzima OPD de *Flavobacterium* (Figura 4). Por esta razón hemos nombrado este marco de lectura abierto "*opdA*".

Algunas diferencias notables se observaron entre la secuencia de *opd* de *Flavobacterium* y la del *opdA* a partir del *A. radiobacter* P230 (Figuras 2 y 3). Parece haber un aminoácido menos en la secuencia señal putativa de la proteína de *opdA* y el sitio de división de señal también es diferente. Adicionalmente, un marco de lectura cerca del terminal 3' del gen *opdA* proporciona *OpdA* otros 16 aminoácidos. Esta región ha sido secuenciada múltiples veces para asegurar que la base extra en *opdA* no es un error de secuenciación.

La enzima OPD nativa es un homodímero que contiene dos iones de zinc por subunidad monomérica (Benning et al., 1995). Los dos residuos His en las posiciones 254 y 257 en la secuencia de la proteína de OPD se localizan cerca del sitio activo bimetalico presente en cada monómero y se piensa que interactúan con los residuos de sitios

activos y el sustrato en el bolsillo de enlace del sustrato. El reemplazo de cada uno de estos residuos His con Arg y Leu, respectivamente, da lugar a enzimas que poseen solo dos átomos metálicos por dímero (diSioudi et al., 1999). La proteína de OpdA tiene Arg y Tyr en las posiciones correspondientes con His 254 y His257 en OPD (Figura 4). Por consiguiente sería esperado que la enzima nativa OpdA contenga solo dos iones metálicos por dímero en lugar de cuatro, como en OPD nativa.

Ejemplo 7 - Actividad de la proteína purificada de OpdA

Para confirmar que el marco de lectura abierto en la Figura 3 codifica la proteína responsable de la actividad hidrolítica de OP, la proteína fue expresada y purificada como una proteína de fusión con la proteína de enlace de maltosa.

Expresión de OpdA y OPD como proteínas de fusión

Las proteínas de OpdA y OPD se expresaron en *Escherichia coli* utilizando la fusión de la proteína pMAL y el sistema de purificación de New England Biolabs, lo que resulta en la expresión de las proteínas de fusión de la proteína de enlace de maltosa (MBP).

Para clonar el *gen opdA* en el vector pMAL-c, el *gen opdA* (sin el dominio del péptido señal) fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores en dirección 5' y 3', 5'GATCGTCTGCAGCCAATCGGTACAGGCGATCTG (SEQ ID NO: 11) y 5'GATCGTAAGCTTTCATCGTTCGGTATCTTGACGGGGAAT (SEQ ID NO: 12), respectivamente. Un sitio de clonación PstI fue insertado en el codón de inicio y un sitio de clonación HindIII en el codón de terminación (bases subrayadas). El fragmento de PCR posteriormente se clonó en los sitios de clonación PstI-HindIII de pMAL-c, para generar el plásmido recombinante, pmal-opdA.

El *gen opd* (Mulbry and Karns, 1989) se clonó en el vector pMAL-c2X (New England Biolabs) de una manera similar. El *gen opd*, sin el dominio del péptido señal, fue amplificado utilizando PCR. Los cebadores del oligonucleótido en dirección 5' y 3', 5'GATCGTGGATCCTCGATCGGCACAGGCGATCGG (SEQ ID NO: 13) y 5'GATCGTAAGCTTTCATGACGCCCGCAAGGTCGG (SEQ ID NO: 14), respectivamente, fueron diseñados para contener un sitio de restricción BamHI en el codón inicial *opd* y un sitio de restricción en el codón de terminación HindIII (bases subrayadas). El fragmento de PCR posteriormente se clonó en los sitios de restricción BamHI-HindIII de pMAL-c2X para generar el plásmido recombinante, pFmal.

Purificación de las proteínas OpdA y OPD

Ambas proteínas de fusión MBP se expresaron en células de *E. coli* DH10 β . La producción óptima de las proteínas de fusión MBP fue obtenida cuando las células log media (OD₆₀₀ = 0.6) fueron inducidas con isopropil- β -D-tiogalactopiranosida 0.1 mM durante 5 horas a 37°C. Las células cultivadas se rompieron por sonicación y la fracción soluble se cargó sobre una resina de amilosa (New England Biolabs), equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH7.5. Las proteínas de fusión MBP fueron eluidas con maltosa 10 mM en Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Las fracciones que contienen actividad hidrolítica del cumafos se mezclaron y dividieron con Xa proteasa (10 μ g/ml; New England Biolabs) durante 5 horas. Las fracciones divididas luego se pasaron a través de una resina de intercambio iónico de sefrosa DEAE. Las proteínas OpdA y OPD divididas no se unieron a esta resina y eluyeron con el volumen vacío. Las fracciones de esta muestra parece que son puras, según se discrimina por SDS-PAGE. La cantidad de proteína en muestras purificadas se calculó de acuerdo con el método de Gill y von Hippel (1989).

Análisis cinéticos de OPD y OpdA

(i) Sustratos

Los parámetros cinéticos se determinaron para la hidrólisis por OpdA y OPD de los siguientes sustratos: cumafos, paratión (O,O-dietil *p*-nitrofenil fosforotioato; Riedel de Haan), metil paratión (O,O-dimetil *p*-nitrofenil fosforotioato; Riedel de Haan), paraoxon (O,O-dietil *p*-nitrofenil fosfato; Sigma), coroxon (3-cloro-4-metil-7-coumarinil dietil fosfato; Alltech), fentión (O,O- dimetil O-[3-metil 4-(metiltio)fenil] fosforotioato; Riedel de Haan), diazinon (labelled - O,O-dietil O-(2-isopropil-4-metil-6- pirimidinil)-fosforotioato; Alltech), dMUP (O,O-dimetil 4-metil-umbelliferil fosfato; un regalo de Alan Devonshire), clorpirifos (O, O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato; Alltech) y fosmet (S-[(1,3-dihidro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2- il)metil O,O-dimetil fosforoditioato; Alltech).

(ii) Ensayos

Todas las reacciones contenían organofosfatos disueltos en metanol, excepto para el fosmet, que fue disuelto en acetona. La concentración de acetona o metanol en las reacciones fue constante al 5%, donde sea apropiado. Todas las reacciones se realizaron en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 a 25°C.

Las velocidades iniciales de las reacciones de OPD y OpdA purificadas con cumafos y coroxon se determinaron utilizando la prueba fluorométrica descrita anteriormente.

Las velocidades iniciales de reacción de ambas OPD y OpdA con dMUP se determinaron utilizando una prueba fluorométrica para cuantificar la formación del producto de hidrólisis, 4-metil umbelliferona (Roth, 1969). La fluorescencia fue medida utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm y una intensidad de emisión de 460 nm.

Las velocidades iniciales de reacción de ambas enzimas purificadas con paratión, metil paratión y paraoxon fueron medidas espectrofotométricamente por cuantificación de la formación del producto de hidrólisis, *p*-nitrofenol, a 405 nm y utilizando un coeficiente de extinción de $17\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dumas *et al.*, 1989b).

Las velocidades iniciales de reacción de OpdA con fentión fueron cuantificadas espectrofotométricamente por el seguimiento de una reducción en la absorbancia a 252 nm (Ibrahim and Cavagnol, 1966). Una falta de hidrólisis del fentión y el fosmet por OPD, fue confirmada por cromatografía de capa delgada después de 24 horas de incubación del sustrato con OPD.

Las velocidades de reacción de OpdA y OPD con clorpirifos, fueron medidas espectrofotométricamente por el seguimiento del aumento en la absorbancia a 276 nm (Dumas *et al.*, 1989b).

La hidrólisis del fosmet según se mide por la cuantificación de la formación de tioles libres durante el curso de la reacción utilizando DTNB (reactivo de Ellman; 5'5 ditio-bis-(ácido 2-nitro benzoico)) como se ha descrito previamente para el seguimiento de las hidrólisis de P-S en organofosfatos (Lai *et al.*, 1995). Esto involucra la adición de DTNB (80 μl de 1 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 y metanol, 1:1 (v/v)) a alícuotas de 20 μl de la reacción tomadas en distintos momentos.

La hidrólisis del diazinon fue monitoreada utilizando diazinon radiomarcado (etil-1- ^{14}C ; 14.8 MBq/mmol) en la prueba de partición radiométrica previamente utilizada por sustratos OP radiomarcados (Campbell *et al.*, 1998). En varias ocasiones durante la reacción, una alícuota (50 μl) fue retirada y se diluyó con 150 μl de agua. Esta luego fue extraída con 500 μl de diclorometano. La fase acuosa superior (150 μl) fue retirada y se cuantificó por centelleo líquido.

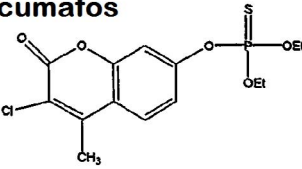
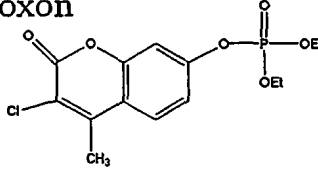
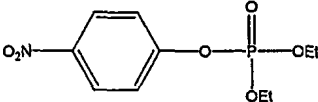
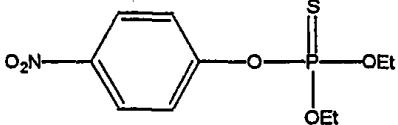
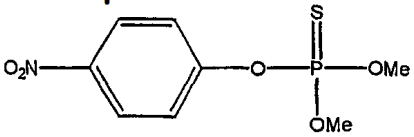
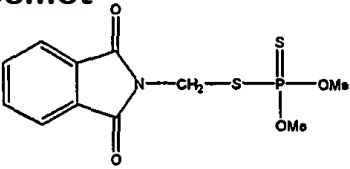
Resultados

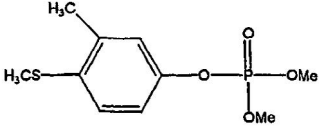
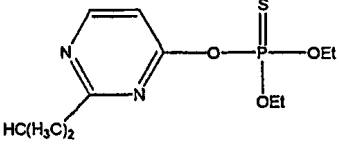
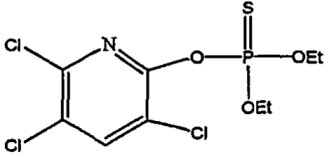
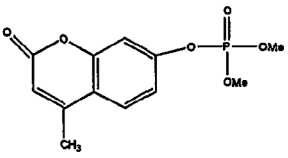
Los resultados de los análisis cinéticos se indican en la Tabla 7. OpdA y OPD fueron capaces de hidrolizar los sustratos cumafos, coroxon, paraoxon, paratión, metil paratión, diazinon, clorpirifos y dMUP. OpdA tuvo un k_{cat} superior para ambos el metil paratión y dMUP, y OPD fue incapaz de hidrolizar tanto el fosmet como el fentión. Una falta de hidrólisis de los últimos dos sustratos también fue observada durante un periodo de 24 horas por cromatografía de capa delgada (Munnecke and Hsieh, 1976). Esto involucra la extracción de una reacción de 100 μl) que contiene sustrato 0.4 mM con un volumen igual de acetato de etilo. La fase orgánica superior se secó suavemente con una corriente de nitrógeno, y el residuo remanente se disolvió en 10 μl de acetona y luego se aplicó a una placa de TLC F₂₅₄ de silica gel neutra (Alltech, NSW, Australia). La placa luego se desarrolló en hexano-cloroformo-metanol (7:2:1) y los compuestos se visualizaron por luz ultra violeta de longitud de onda corta. La hidrólisis de ambos fosmet y fentión se observaron consistentemente para OpdA y no se observó hidrólisis para OPD.

En resumen, varias diferencias en la especificidad del sustrato entre OpdA y OPD se observaron. OpdA hidrolizó el fentión y el fosmet mientras que OPD no. Adicionalmente, hubo una diferencia significativa entre OpdA y OPD en los valores k_{cat} para dimetil OPs, con OpdA que posee un k_{cat} superior para metil-paratión y dMUP que OPD. También se espera que OpdA, como OPD (Dumas *et al.*, 1989a; Yang *et al.*, 1995), hidrolice los agentes nerviosos OP.

Como se discute anteriormente, los dos residuos His en las posiciones 254 y 257 en la secuencia de la proteína de OPD se localizan cerca del sitio activo bimetálico presente en cada monómero y se piensa que interactúan con los residuos de sitios activos y el sustrato en el bolsillo de enlace del sustrato (Benning *et al.*, 1995). El reemplazo de cada uno de estos residuos His con Arg y Leu, respectivamente, da lugar a enzimas con solo un ion metálico por monómero, aumentó la actividad catalítica para sustratos más grandes tales como demeton, y disminuyó la actividad para las sustancias más pequeñas como el paraoxon (diSioudi *et al.*, 1999).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de enzimas OpdA y OPD purificadas por varios sustratos OP.

Sustrato/Estructura	K _m (μM)		k _{cat} (min ⁻¹)	
	OpdA	OPD	OpdA	OPD
cumafos 	8.3±1.8	21.4±6.0	12.4±0.6	14.1±2.6
coroxon 	15.9±1.9	25.3±1.3	22.7±0.1	39.5±5.3
paraoxon 	242±61	225±14	33.5±0.5	46.0±0.4
paratión 	92.6±6.4	50.6±12.2	21.9±2.0	23.5±0.2
metil-paratión 	61.2±2.3	32.9±1.7	94.2±0.8	5.46±0.05
fosmet 	208.3±13.2	-	0.100±0.002	-

fention 	148.6±17.2	-	1.63±0.01	-
diazinon 	51.9±4.5	54.2±5.4	65.2±6.7	56.5±2.9
clorpirifos 	32.6±8.1	47.2±3.0	0.525±0.005	0.90±0.01
dMUP 	66.0±9.1	46.7±2.8	81.7±9.1	20.5±2.3

Se ha postulado que los cambios en el número de iones metálicos unidos, pueden mejorar la flexibilidad estructural y mejorar el acceso de sustratos grandes al sitio activo, mientras que simultáneamente disminuye la actividad para sustratos más pequeños. La proteína de OpdA tiene Arg y Tyr en las posiciones correspondientes a His 254 y His257 en OPD (Figura 4). Por consiguiente, es sorprendente que OpdA posea un k_{cat} superior para el metil-paratión que OPD, aún su k_{cat} para el sustrato etil-paratión más grande fue similar a aquel de OPD. Resultados similares fueron obtenidos para el par de sustrato cumafos/dMUP. Evidentemente, las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de OpdA y OPD distintas de aquellas en los residuos 253/254 y 256/257 afectan la actividad catalítica.

10 Ejemplo 8 - Identificación de mutantes de OpdA con especificidad alterada

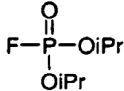
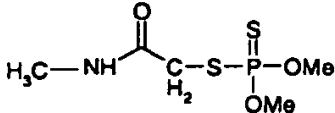
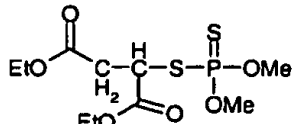
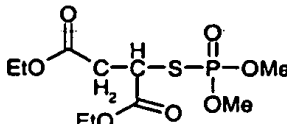
El plásmido pmal-opdA fue transformado en la cepa mutagénica de *E. coli* XL1-roja. El plásmido fue propagado en esta cepa durante 120 generaciones, con extracciones de plásmido que ocurren después de cada 24 generaciones. Estos plásmidos luego fueron transformados en *E. coli* DH10 β y la mezcla de transformación se diluyó a 50 ml en LB que contiene ampicilina.

- 15 Cuando el cultivo alcanzó un OD₅₉₅ de 0.3, la expresión de proteína de fusión fue inducida con IPTG 0.1 mM, y la inducción permite que se produzca durante 5 horas. El cultivo luego fue peletizado por centrifugación, se volvió a suspender en 2 ml de Tris-HCl 50 mM pH7.5 estéril con la adición de malatión a una concentración final de 440 μ M. Esta mezcla de ensayo se dejó por 1 hora y la hidrólisis del malatión se detectó utilizando el reactivo de Ellman (DTNB) (Lai et al., 1995).
- 20 Las mezclas que contienen actividad luego se diluyeron y se sembraron en placas sobre placas LB con ampicilina. Las colonias individuales luego fueron seleccionadas y probadas para la actividad hidrolítica del malatión y del dimetoato como se describe anteriormente. Además dos colonias (designadas pmal-opdA1 y pmal-opdA2) fueron seleccionadas y analizadas.

Las secuencias de los dos mutantes fueron examinadas y comparadas con la de OpdA del tipo salvaje. OpdA1 contenía 4 mutaciones (P42S, P134S, A170S y S237G) (SEQ ID NO: 3) y OpdA2 contenía una mutación (A119D) (SEQ ID NO: 4). El sistema de numeración se basa en numeración de OpdA del residuo de aminoácidos, teniendo en cuenta la secuencia señal. Para correlacionar la numeración con OPD, adicionar uno a cada número.

- 5 OpdA y los dos mutantes OpdA1 y OpdA2 fueron purificados después de la expresión en el plásmido pCY76. Los genes se amplificaron por PCR utilizando los cebadores pETopdA5 (5'GATCGT GAATTCCATATG CCAATCGGTACA, con el sitio *EcoRI* subrayado y *NdeI* doble subrayado) (SEQ ID NO: 15) y pETopdA3 (5'GAT CGTGGATCCTCATCGTTTCGGTATCTTG, con el sitio *BamHI* subrayado) (SEQ ID NO:16). Los fragmentos de PCR
- 10 fueron digeridos con *EcoRI* y *BamHI* y ligados con pBluescript digerido de manera similar. La secuencia de los fragmentos se confirmó en este vector. Los derivados de pBS luego fueron digeridos con *NdeI-BamHI* y ligados con *NdeI-Bg/II*-digerido pCY76. Los clones positivos se cultivaron en 500 ml de LB. Después de que los cultivos han crecido durante 24 horas, fueron peletizados por centrifugación a 7000 g, 15 minutos a 4°C. Los pellets se volvieron a suspender en 4 ml de Tris-HCl 50 mM pH7.5 y se rompieron por sonicación (Harcourt *et al.*, 2002). Los extractos
- 15 libres de células luego fueron cargados sobre una columna de sefarosa DEAE que fue pre-equilibrada con Tris-HCl 50mM pH7.5. OpdA y las variantes no se unieron a esta columna y el eluyente se recolectó y colocó sobre una columna de sefarosa heparina preequilibrada con Tris-HCl 50 mM pH7.5 (Pharmacia). OpdA y las variantes se unieron por esta columna y se eluyeron con Tris-HCl 50 mM pH7.5/NaCl 0.1 M. Después de esta etapa de la columna, OpdA se consideró pura por SDS-PAGE. Las cinéticas de las proteínas fueron examinadas contra los OPs alifáticos, dimetoato, malatión, malaoxon y DFP (diisopropil fluorofosfato) (Tabla 8). Ambos mutantes fueron activos
- 20 contra dimetoato, malatión y malaoxon, mientras que el OpdA del tipo salvaje no lo fue. Adicionalmente, los mutantes habían aumentado la actividad para DFP en comparación con la de los OpdA del tipo salvaje

Tabla 8. Los parámetros cinéticos de OpdA purificado y los mutantes, OpdA1 y OpdA2, para varios sustratos OP.

Sustrato	K _m (μM)			k _{cat} (min ⁻¹)		
	OpdA	OpdA1	OpdA2	OpdA	OpdA1	OpdA2
DFP 	2.3± 0.4	18.1± 0.6	9.6± 5.6	1.36± 0.04	45.9± 0.9	27.5± 0.7
dimetoato 	nd ¹	78.9± 17.7	14.3± 4.2	nd	1.22± 0.07	1.4±0.1
malation 	nd	33.3± 14.2	40.9± 7.2	nd	1.21± 0.07	1.43± 0.07
malaoxon 	nd	159.2± 28.2	45.7± 8.9	nd	1.98± 0.05	1.84± 0.06
¹ nd = no detectado						

Cualquier discusión de los documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que han sido incluidos en la presente especificación tiene solamente el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No se debe tomar como una admisión de que alguna o todas estas materias forman parte de la base del oficio previo o fueron de conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención como existía en Australia antes de la fecha de prioridad de cada una de las reivindicaciones de esta aplicación.

REFERENCIAS

Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M. and Holden, H.M. (1995). Biochemistry 34: 7973-7978.

Billecke, S.S., Primo-Parmo, S.L., Dunlop, C.S., Doorn, J.A., La Du, B.N. and Broomfield, C.A. (1999). Chemico-Biological Interactions 120: 251-256.

Bowen, A.R.StG. and Pemberton, J.M. (1985). Mercury resistance transposon Tn813 mediates chromosome transfer in *Rhodospseudomonas sphaeroides* and intergeneric transfer in pBR322. In Helsinki, D.R., S.N. Cohen, D.B. Clewell, D.A. Jackson and A. Hollaender (ed.), Plasmids in Bacteria. Plenum Press, New York, p105-115.

Broomfield, C.A., Lockridge, O. and Millard, C.B. (1999). Chemico-Biological Interactions 119-120: 413-418.

- Buchbinder, J.L., Stephenson, R.C., Dresser, M.J., Pitera, J.W., Scanlan, T.S. and Fletterick, R.J. (1998). *Biochemistry* 37: 5096-5160.
- Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. (1998). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 139-150.
- 5 Cheng, T., DeFrank, J.J. and Rastogi, V.K. (1999). *Chemico-Biological Interactions* 119-120: 455-462.
- Claudianos, C., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. (1999). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 675-686.
- Cook, A.M., Daughton, C.G. and Alexander, M. (1978). *Applied and Environmental Microbiology* 36: 668-672.
- Davies, J.A., Buchman, V.L., Krylova, O. and Ninkina, N.N. (1997). *FEBS Letters* 410: 378-382.
- diSioudi, B., Grimsley, J.K., Lai, K. and Wild, J.R. (1999). *Biochemistry* 38: 2866-2872.
- 10 Doom, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N. (1999). *Chemico-Biological Interactions* 120: 235-241.
- Dumas, D.P., Wild, J.R. and Raushel, F.M. (1989a). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11: 235-243.
- Dumas, D.P., S.R. Caldwell, J.R. Wild and F.M. Raushel. (1989b). *Journal of Biological Chemistry* 264: 19659-19665.
- Dumas, D.P., Wild, J.R. and Raushel, F.M. (1990). *Experientia* 46: 729-731.
- 15 Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W. and Bert, N.L. (1991). *Drug Metabolism and Disposition* 19: 100-106.
- Gardiner, A.T., MacKenzie, R.C., Barrett, S.J., Kaiser, K. and Cogdell, R.J. (1996). *Photosynthesis Research* 49: 223-235.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). *Analytical Biochemistry* 182: 319-326.
- 20 Gordon, R.K., Feaster, S.R., Russell, A.J., LeJeune, K.E., Maxwell, M.D., Lenz, D.E., Ross, M. and Doctor, B.P. (1999). *Chemical-Biological Interactions* 14: 463-470.
- Harcourt, R.L., Horne, I., Sutherland, T.D., Hammock, B.D., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. (2002) *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 263-268.
- Harper, L.L., McDaniel, S., Miller, C.E. and Wild, J.R. (1988). *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2586-2589.
- 25 Hong, S.B. and Raushel, F.M. (1999). *Chemico-Biological Interactions* 120: 225-234.
- Hoskin, F.C.G., Walker, J.E. and Mello, C.M. (1999). *Chemico-Biological Interactions* 120: 399-404.
- Ibrahim, F.B. and Cavagnol, J.C. (1966). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 14: 369-371.
- Kovac, N. (1956). *Nature* 178: 703.
- 30 Krieg, N.R. and Holt, J.G. (ed.) 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Lai, K., Stolowich, N.J. and Wild, J.R. (1995). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 318: 59-64.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, p115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York.
- LeJuene, K.E., Wild, J.R. and Russell, A.J. (1998). *Nature* 395: 27-28.
- 35 Mulbry, W.W. (1992) *Gene* 121: 149-153.
- Mulbry, W.W. and Karns, J.S. (1989). *Journal of Bacteriology* 171: 6740-6746.

- Mulbry, W.W. and Kearney, P.C. (1991). *Crop Protection* 10: 334-345.
- Munnecke, D.M. and Hsieh, D.P. (1976). *Applied and Environmental Microbiology* 31: 63-69.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 7464-7468.
- 5 Pearson, W.R. and D.J. Lipman. (1988). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 2444-2448.
- Petrikovics, I., Cheng, T.C., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Yin, R., DeFrank, J.J., Jaing, J., Zong, Z.H., McGuinn, W.D., Sylvester, D., Pei, L., Madec, J., Tamulinas, C., Jaszberenyi, J.C., Barcza, T. and Way, J.L. (2000a). *Toxicology Science* 57: 16-21.
- 10 Petrikovics, I., McGuinn, W.D., Sylvester, D., Yuzapavik, P., Jaing, J., Way, J.L., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Yin, R., Cheng, T.C., and DeFrank, J.J. (2000b). *Drug Delivery* 7: 83-89.
- Rainey, F.A., M. Dorsch, H.W. Morgan and E. Stackebrandt. (1992). *Systematic and Applied Microbiology* 15: 197-202.
- Rekha, M., Thakur, M.S., and Karanth, N.G. (2000). *Critical Reviews in Biotechnology* 20: 213-235.
- Rosenberg, A. and Alexander, M. (1979). *Applied and Environmental Microbiology* 37: 886-891.
- 15 Roth, M. (1969). *Methods of Biochemical Analysis* 17: 189-285.
- Sambrook, Fritsch, J.E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - A laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Scanlen, C.S. and Reid, R.C. (1995). *Chemistry and Biology* 2: 71-75.
- Serdar, C.M., Murdock, D.C. and Rohde, M.F. (1989). *Bio/Technology* 7: 1151-1155.
- 20 Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C-L, Adkins, S., Lockridge, O and La Du, B.N. (1995). *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 7187-7191.
- Wang, Q., Sun, M., Zhang, H. and Huang, C. (1998). *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* 12: 213-217.
- Wang, F., Xiao, M. and Shaofeng, M. (1993). *Journal of Biochemistry and Toxicology* 8: 161-166.
- Yang, F., Wild, J.R. and Russell, A.J. (1995). *Biotechnology Progress* 11: 471-474.
- 25 Yanisch-Perron, Vieira, C.J. and Messing, J. (1985). *Gene* 33: 103-119.
- Zimmerer, R.P., Hamilton, R.H. and Pootjes, C. (1966). *Journal of Bacteriology* 92: 746-750.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
- <120> Fosfotriesterasa a partir de *Agrobacterium radiobacter* P230
- 30 <130> 500480
- <150> AU PR 5023
- <151> 2001-05-15
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 384

<212> PRT

<213> Agrobacterium radiobacter

5 <400> 1

Met	Gln	Thr	Arg	Arg	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Thr	Leu
1				5					10					15	

Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly	Cys	Ala	Ser	Met	Ala	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr
			20					25					30		

Gly	Asp	Leu	Ile	Asn	Thr	Val	Arg	Gly	Pro	Ile	Pro	Val	Ser	Glu	Ala
		35					40					45			

Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	His	Glu	His	Ile	Cys	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Phe
	50					55					60				

Leu Arg Ala Trp Pro Glu Phe Phe Gly Ser Arg Lys Ala Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Lys Ala Val Arg Gly Leu Arg His Ala Arg Ser Ala Gly Val Gln Thr
 85 90 95

Ile Val Asp Val Ser Thr Phe Asp Ile Gly Arg Asp Val Arg Leu Leu
 100 105 110

Ala Glu Val Ser Arg Ala Ala Asp Val His Ile Val Ala Ala Thr Gly
 115 120 125

Leu Trp Phe Asp Pro Pro Leu Ser Met Arg Met Arg Ser Val Glu Glu
 130 135 140

Leu Thr Gln Phe Phe Leu Arg Glu Ile Gln His Gly Ile Glu Asp Thr
 145 150 155 160

Gly Ile Arg Ala Gly Ile Ile Lys Val Ala Thr Thr Gly Lys Ala Thr
 165 170 175

Pro Phe Gln Glu Leu Val Leu Lys Ala Ala Ala Arg Ala Ser Leu Ala
 180 185 190

Thr Gly Val Pro Val Thr Thr His Thr Ser Ala Ser Gln Arg Asp Gly
 195 200 205

Glu Gln Gln Ala Ala Ile Phe Glu Ser Glu Gly Leu Ser Pro Ser Arg
 210 215 220

Val Cys Ile Gly His Ser Asp Asp Thr Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Thr
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Ala Arg Gly Tyr Leu Val Gly Leu Asp Arg Met Pro Tyr
 245 250 255

Ser Ala Ile Gly Leu Glu Gly Asn Ala Ser Ala Leu Ala Leu Phe Gly
 260 265 270

Thr Arg Ser Trp Gln Thr Arg Ala Leu Leu Ile Lys Ala Leu Ile Asp
 275 280 285

Arg Gly Tyr Lys Asp Arg Ile Leu Val Ser His Asp Trp Leu Phe Gly
 290 295 300

Phe Ser Ser Tyr Val Thr Asn Ile Met Asp Val Met Asp Arg Ile Asn
305 310 315 320

Pro Asp Gly Met Ala Phe Val Pro Leu Arg Val Ile Pro Phe Leu Arg
325 330 335

Glu Lys Gly Val Pro Pro Glu Thr Leu Ala Gly Val Thr Val Ala Asn
340 345 350

Pro Ala Arg Phe Leu Ser Pro Thr Val Arg Ala Val Val Thr Arg Ser
355 360 365

Glu Thr Ser Arg Pro Ala Ala Pro Ile Pro Arg Gln Asp Thr Glu Arg
370 375 380

<210> 2

<211> 356

<212> PRT

5 <213> Agrobacterium radiobacter

<400> 2

Pro Ile Gly Thr Gly Asp Leu Ile Asn Thr Val Arg Gly Pro Ile Pro
1 5 10 15

Val Ser Glu Ala Gly Phe Thr Leu Thr His Glu His Ile Cys Gly Ser
20 25 30

Ser Ala Gly Phe Leu Arg Ala Trp Pro Glu Phe Phe Gly Ser Arg Lys
35 40 45

Ala Leu Ala Glu Lys Ala Val Arg Gly Leu Arg His Ala Arg Ser Ala
50 55 60

Gly Val Gln Thr Ile Val Asp Val Ser Thr Phe Asp Ile Gly Arg Asp
65 70 75 80

Val Arg Leu Leu Ala Glu Val Ser Arg Ala Ala Asp Val His Ile Val
85 90 95

Ala Ala Thr Gly Leu Trp Phe Asp Pro Pro Leu Ser Met Arg Met Arg
 100 105 110

Ser Val Glu Glu Leu Thr Gln Phe Phe Leu Arg Glu Ile Gln His Gly
 115 120 125

Ile Glu Asp Thr Gly Ile Arg Ala Gly Ile Ile Lys Val Ala Thr Thr
 130 135 140

Gly Lys Ala Thr Pro Phe Gln Glu Leu Val Leu Lys Ala Ala Ala Arg
 145 150 155 160

Ala Ser Leu Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Thr His Thr Ser Ala Ser
 165 170 175

Gln Arg Asp Gly Glu Gln Gln Ala Ala Ile Phe Glu Ser Glu Gly Leu
 180 185 190

Ser Pro Ser Arg Val Cys Ile Gly His Ser Asp Asp Thr Asp Asp Leu
 195 200 205

Ser Tyr Leu Thr Gly Leu Ala Ala Arg Gly Tyr Leu Val Gly Leu Asp
 210 215 220

Arg Met Pro Tyr Ser Ala Ile Gly Leu Glu Gly Asn Ala Ser Ala Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Phe Gly Thr Arg Ser Trp Gln Thr Arg Ala Leu Leu Ile Lys
 245 250 255

Ala Leu Ile Asp Arg Gly Tyr Lys Asp Arg Ile Leu Val Ser His Asp
 260 265 270

Trp Leu Phe Gly Phe Ser Ser Tyr Val Thr Asn Ile Met Asp Val Met
 275 280 285

Asp Arg Ile Asn Pro Asp Gly Met Ala Phe Val Pro Leu Arg Val Ile
 290 295 300

Pro Phe Leu Arg Glu Lys Gly Val Pro Pro Glu Thr Leu Ala Gly Val
 305 310 315 320

Thr Val Ala Asn Pro Ala Arg Phe Leu Ser Pro Thr Val Arg Ala Val
 325 330 335

Val Thr Arg Ser Glu Thr Ser Arg Pro Ala Ala Pro Ile Pro Arg Gln
 340 345 350

Asp Thr Glu Arg
 355

<210> 3

<211> 384

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Mutante de OpdA

<400> 3

Met Gln Thr Arg Arg Asp Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ile Thr Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Leu Ala Gly Cys Ala Ser Met Ala Arg Pro Ile Gly Thr
 20 25 30

Gly Asp Leu Ile Asn Thr Val Arg Gly Ser Ile Pro Val Ser Glu Ala
 35 40 45

Gly Phe Thr Leu Thr His Glu His Ile Cys Gly Ser Ser Ala Gly Phe
 50 55 60

Leu Arg Ala Trp Pro Glu Phe Phe Gly Ser Arg Lys Ala Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Lys Ala Val Arg Gly Leu Arg His Ala Arg Ser Ala Gly Val Gln Thr
 85 90 95

Ile Val Asp Val Ser Thr Phe Asp Ile Gly Arg Asp Val Arg Leu Leu
 100 105 110

Ala Glu Val Ser Arg Ala Ala Asp Val His Ile Val Ala Ala Thr Gly
115 120 125

Leu	Trp	Phe	Asp	Pro	Ser	Leu	Ser	Met	Arg	Met	Arg	Ser	Val	Glu	Glu
	130					135					140				

Leu Thr Gln Phe Phe Leu Arg Glu Ile Gln His Gly Ile Glu Asp Thr
145 150 155 160

Gly Ile Arg Ala Gly Ile Ile Lys Val Ser Thr Thr Gly Lys Ala Thr
165 170 175

Pro Phe Gln Glu Leu Val Leu Lys Ala Ala Ala Arg Ala Ser Leu Ala
180 . 185 190

Thr Gly Val Pro Val Thr Thr His Thr Ser Ala Ser Gln Arg Asp Gly
195 200 205

Glu Gln Gln Ala Ala Ile Phe Glu Ser Glu Gly Leu Ser Pro Ser Arg
210 215 220

Val	Cys	Ile	Gly	His	Ser	Asp	Asp	Thr	Asp	Asp	Leu	Gly	Tyr	Leu	Thr
225					230					235					240

Gly Leu Ala Ala Arg Gly Tyr Leu Val Gly Leu Asp Arg Met Pro Tyr
245 250 255

Ser Ala Ile Gly Leu Glu Gly Asn Ala Ser Ala Leu Ala Leu Phe Gly
260 265 270

Thr Arg Ser Trp Gln Thr Arg Ala Leu Leu Ile Lys Ala Leu Ile Asp
275 280 285

Arg Gly Tyr Lys Asp Arg Ile Leu Val Ser His Asp Trp Leu Phe Gly
290 295 300

Phe Ser Ser Tyr Val Thr Asn Ile Met Asp Val Met Asp Arg Ile Asn
305 310 315 320

Pro Asp Gly Met Ala Phe Val Pro Leu Arg Val Ile Pro Phe Leu Arg
325 330 335

Glu Lys Gly Val Pro Pro Glu Thr Leu Ala Gly Val Thr Val Ala Asn
340 345 350

Pro Ala Arg Phe Leu Ser Pro Thr Val Arg Ala Val Val Thr Arg Ser
355 360 365

Glu Thr Ser Arg Pro Ala Ala Pro Ile Pro Arg Gln Asp Thr Glu Arg
370 375 380

<210> 4

<211> 384

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Mutante de OpdA

<400> 4

Met Gln Thr Arg Arg Asp Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ile Thr Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Leu Ala Gly Cys Ala Ser Met Ala Arg Pro Ile Gly Thr
20 25 30

Gly Asp Leu Ile Asn Thr Val Arg Gly Pro Ile Pro Val Ser Glu Ala
35 40 45

Gly Phe Thr Leu Thr His Glu His Ile Cys Gly Ser Ser Ala Gly Phe
50 55 60

Leu Arg Ala Trp Pro Glu Phe Phe Gly Ser Arg Lys Ala Leu Ala Glu
65 70 75 80

Lys Ala Val Arg Gly Leu Arg His Ala Arg Ser Ala Gly Val Gln Thr
85 90 95

Ile Val Asp Val Ser Thr Phe Asp Ile Gly Arg Asp Val Arg Leu Leu
100 105 110

Ala Glu Val Ser Arg Ala Asp Asp Val His Ile Val Ala Ala Thr Gly
115 120 125

Leu Trp Phe Asp Pro Pro Leu Ser Met Arg Met Arg Ser Val Glu Glu
130 135 140

Leu Thr Gln Phe Phe Leu Arg Glu Ile Gln His Gly Ile Glu Asp Thr
145 150 155 160

Gly Ile Arg Ala Gly Ile Ile Lys Val Ala Thr Thr Gly Lys Ala Thr
165 170 175

Pro Phe Gln Glu Leu Val Leu Lys Ala Ala Ala Arg Ala Ser Leu Ala
180 185 190

Thr Gly Val Pro Val Thr Thr His Thr Ser Ala Ser Gln Arg Asp Gly
195 200 205

Glu Gln Gln Ala Ala Ile Phe Glu Ser Glu Gly Leu Ser Pro Ser Arg
210 215 220

Val	Cys	Ile	Gly	His	Ser	Asp	Asp	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Thr
225					230					235					240

Gly Leu Ala Ala Arg Gly Tyr Leu Val Gly Leu Asp Arg Met Pro Tyr
245 250 255

Ser Ala Ile Gly Leu Glu Gly Asn Ala Ser Ala Leu Ala Leu Phe Gly
260 265 270

Thr Arg Ser Trp Gln Thr Arg Ala Leu Leu Ile Lys Ala Leu Ile Asp
275 280 285

Arg Gly Tyr Lys Asp Arg Ile Leu Val Ser His Asp Trp Leu Phe Gly
290 295 300

Phe Ser Ser Tyr Val Thr Asn Ile Met Asp Val Met Asp Arg Ile Asn
305 310 315 320

Pro Asp Gly Met Ala Phe Val Pro Leu Arg Val Ile Pro Phe Leu Arg
325 330 335

Glu Lys Gly Val Pro Pro Glu Thr Leu Ala Gly Val Thr Val Ala Asn
 340 345 350

Pro Ala Arg Phe Leu Ser Pro Thr Val Arg Ala Val Val Thr Arg Ser
 355 360 365

Glu Thr Ser Arg Pro Ala Ala Pro Ile Pro Arg Gln Asp Thr Glu Arg
 370 375 380

<210> 5

<211> 1155

<212> ADN

5 <213> Agrobacterium radiobacter

<400> 5

```

atgcaaacga gaagagatgc acttaagtct gcggccgcaa taactctgct cggcggcttg      60
gctgggtgtg caagcatggc ccgaccaatc ggtacaggcg atctgattaa tactgttcgc      120
ggccccattc cagtttcgga agcgggcttc aactgaccc atgagcatat ctgcggcagt      180
tcggcgggat tcctacgtgc gtggccggag tttttcggta gccgcaaagc tctagcggaa      240
aaggctgtga gaggattacg ccatgccaga tcggctggcg tgcaaaccat cgtcgatgtg      300
tcgactttcg atatcggtcg tgacgtccgt ttattggccg aagtttcgcg ggccgccgac      360
gtgcatatcg tggcggcgac tggcttatgg ttcgaccgcg cactttcaat gcgaatgcgc      420
agcgtcgaag aactgaccca gttcttctctg cgtgaaatcc aacatggcat cgaagacacc      480
gggtattagg cgggcattat caaggctcgcg accacaggga aggcgacccc ctttcaagag      540
ttggtgttaa aggcagccgc gcgggccagc ttggccaccg gtgttcgggt aaccactcac      600
acgtcagcaa gtcagcgcg a tggcgagcag caggcagcca tttttgaatc cgaagggttg      660
agccccctcac gggtttgtat cggtcacagc gatgatactg acgatttgag ctacctaacc      720
ggcctcgctg cgcgcgata cctcgctcgt ttagatcgca tgccgtacag tgcgattggt      780
ctagaaggca atgcgagtgc attagcgctc tttggtactc ggtcgtggca aacaagggct      840
ctcttgatca aggcgctcat cgaccgaggc tacaaggatc gaatcctcgt ctcccatgac      900
tggctgttcg ggttttcgag ctatgtcacg aacatcatgg acgtaatgga tcgcataaac      960
ccagatggaa tggccttcgt ccctctgaga gtgatcccat tcctacgaga gaagggcgctc     1020

```

ccgccgga aa cgctagcagg cgtaaccgtg gccaatcccg cgcggttctt gtcaccgacc 1080
 gtgcggggccg tcgtgacacg atctgaaact tcccgccttg ccgcgcctat tcccgcgtcaa 1140
 gataccgaac gatga 1155

<210> 6

<211> 1071

<212> ADN

5 <213> Agrobacterium radiobacter

<400> 6

ccaatcggta caggcgatct gattaatact gttcgcggcc ccattccagt ttcggaagcg 60
 ggcttcacac tgacccatga gcatatctgc ggcagttcgg cgggattcct acgtgcgtgg 120
 ccggagtttt tcggtagccg caaagctcta gcggaaaagg ctgtgagagg attacgccat 180
 gccagatcgg ctggcgtgca aaccatcgtc gatgtgtcga ctttcgatat cggtcgtgac 240
 gtccgtttat tggccgaagt ttcgcggggc gccgacgtgc atatcgtggc ggcgactggc 300
 ttatggttcg acccgccact ttcaatgcga atgcgcagcg tcgaagaact gaccagttc 360
 ttctcgcgtg aaatccaaca tggcatcgaa gacaccggta ttagggcggg cattatcaag 420
 gtcgcgacca cagggaaggc gacccccctt caagagttgg tgttaaaggc agccgcgcgg 480
 gccagcttgg ccaccggtgt tccggttaacc actcacacgt cagcaagtca gcgcgatggc 540
 gagcagcagg cagccatatt tgaatccgaa ggtttgagcc cctcacgggt ttgtatcggc 600
 cacagcgatg atactgacga tttagctac ctaaccggcc tcgctgcgcg cggatacctc 660
 gtcggttttag atcgcgatgcc gtacagtgcg attggcttag aaggcaatgc gagtgcatta 720
 gcgctctttg gtactcggtc gtggcaaaca agggctctct tgatcaaggc gtcacatcgac 780
 cgaggctaca aggatcgaat cctcgtctcc catgactggc tggtcggggt ttcgagctat 840
 gtcacgaaca tcatggacgt aatggatcgc ataaaccag atggaatggc cttcgtccct 900
 ctgagagtga tcccattcct acgagagaag ggcgtcccgc cggaacgct agcaggcgta 960
 accgtggcca atcccgcgcg gttcttgtca ccgaccgtgc gggccgtcgt gacacgatct 1020
 gaaacttccc gccctgcccgc gcctattccc cgtcaagata ccgaacgatg a 1071

<210> 7

<211> 1155

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Mutante de OpdA

5 <400> 7

```

atgcaaacga gaagagatgc acttaagtct gcggccgcaa taactctgct cggcggccttg      60
gctgggtgtg caagcatggc cggaccaatc ggtacaggcg atctgattaa tactgttcgc      120
ggctccattc cagtttcgga agcgggcttc aactgaccc atgagcatat ctgcggcagt      180
tcggcgggat tcctacgtgc gtggccggag tttttcggta gccgcaaagc tctagcggaa      240
aaggctgtga gaggattacg ccatgccaga tcggctggcg tgcaaaccat cgtcgatgtg      300
tcgactttcg atatcggtcg tgacgtccgt ttattggccg aagtttcgcg ggccgccgac      360
gtgcatatcg tggcggcgac tggcttatgg ttcgaccgt cactttcaat gcgaatgcgc      420
agcgtcgaag aactgaccca gttcttcctg cgtgaaatcc aacatggcat cgaagacacc      480
ggattaggga cgggcattat caaggtctcg accacaggga aggcgacccc ctttcaagag      540
ttgggtgtta aggagccgc gcgggccagc ttggccaccg gtgttcggt aaccactcac      600
acgtcagcaa gtcagcgcga tggcgagcag caggcagcca tatttgaatc cgaaggtttg      660
agccccctac gggtttgtat cggtcacagc gatgatactg acgatttggg ctacctaac      720
ggcctcgctg cgcgcggata cctcgctcgt ttagatcgca tgccgtacag tgcgattggt      780
ctagaaggca atgcgagtgc attagcgtc tttggtactc ggtcgtggca aacaagggt      840
ctcttgatca aggcgctcat cgaccgagc tacaaggatc gaatcctcgt ctcccatgac      900
tggtctgttc ggttttcgag ctatgtcacg aacatcatgg acgtaatgga tcgcataaac      960
ccagatggaa tggccttcgt ccctctgaga gtgatcccat tcctacgaga gaagggcgtc     1020
ccgccggaaa cgctagcagg cgtaaccgtg gccaatcccg cgcggttctt gtcaccgacc     1080
gtgcggggccg tcgtgacacg atctgaaact tccgcacctg ccgcgcctat tcccgtcaa     1140
gataccgaac gatga                                             1155

```

<210> 8

<211> 1155

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Mutante de OpdA

<400> 8

```

atgcaaacga gaagagatgc acttaagtct gcggccgcaa taactctgct cggcggccttg      60
gctgggtgtg caagcatggc ccgaccaatc ggtacaggcg atctgattaa tactgttcgc      120
ggccccattc cagtttcgga agcggggcttc acactgaccc atgagcatat ctgcggcagt      180
tcggcgggat tcctacgtgc gtggccggag tttttcggtg gccgcaaagc tctagcggaa      240
aaggctgtga gaggattacg ccatgccaga tcggctggcg tgcaaaccat cgtcgatgtg      300
tcgactttcg atatcggtcg tgacgtccgt ttattggccg aagtttcgcg ggccgacgac      360
gtgcataatc tggcggcgac tggccttatg ttcgaccgcg cactttcaat gcgaatgcgc      420
agcgtcgaag aactgaccca gttcttcctg cgtgaaatcc aacatggcat cgaagacacc      480
ggtattaggg cgggcattat caaggctcgcg accacaggga aggcgacccc ctttcaagag      540
ttgggtgtta aggcagccgc gcgggccagc ttggccaccg gtgttccggt aaccactcac      600
acgtcagcaa gtcagcgcga tggcgagcag caggcagcca tatttgaatc cgaaggtttg      660
agccccctac gggtttgtat cggtcacagc gatgatactg acgatttgag ctacctaacc      720
ggcctcgtcg cgcgcgata cctcgtcggg ttagatcgca tgccgtacag tgcgattggt      780
ctagaaggca atgcgagtgc attagcgtc tttggtactc ggtcgtggca aacaagggct      840
ctcttgatca aggcgctcat cgaccgaggc tacaaggatc gaatcctcgt ctcccatgac      900
tggtctgttc ggttttcgag ctatgtcacg aacatcatgg acgtaatgga tcgcataaac      960
ccagatggaa tggccttcgt ccctctgaga gtgatcccat tcctacgaga gaagggcgctc     1020
ccgccggaaa cgctagcagg cgtaaccgtg gccaatcccg cgcggttctt gtcaccgacc     1080
gtgcggggccg tcgtgacacg atctgaaact tccgcacctg ccgcgcctat tccccgtcaa     1140
gataccgaac gatga                                     1155

```

<210> 9

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de PCR para el gen de ARN 16S

10 <400> 9

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de PCR para el gen de ARN 16S

<400> 10

tacggytacc ttgttacgac tt 22

10 <210> 11

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cebador de PCR para el gen OpdA

<400> 11

gatcgtctgc agccaatcgg tacaggcgat ctg 33

<210> 12

<211> 39

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de PCR para el gen OpdA

<400> 12

25 gatcgtaagc ttcatcgtt cggtatcttg acggggaat 39

<210> 13

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> cebador de PCR para el gen OpdA

<400> 13
gatcgtggat cctcgatcgg cacaggcgat cgg 33
<210> 14
<211> 33
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador de PCR para el gen OpdA
<400> 14
10 gatcgtgaagc ttcatgacg cccgcaaggt cgg 33
<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> cebador de PCR
<400> 15
gatcgtgaat tccatagcc aatcggtaga 30
<210> 16
20 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador de PCR
25 <400> 16
gatcgtggat cctcatcggt cggtatcttg 30
<210> 17
<211> 365
<212> PRT
30 <213> Flavobacterium sp.
<400> 17

Met Gln Thr Arg Arg Val Val Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala Gly Thr
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Leu Ala Gly Cys Ala Ser Val Ala Gly Ser Ile Gly
20 25 30

Thr Gly Asp Arg Ile Asn Thr Val Arg Gly Pro Ile Thr Ile Ser Glu
35 40 45

Ala Gly Phe Thr Leu Thr His Glu His Ile Cys Gly Ser Ser Ala Gly
50 55 60

Phe Leu Arg Ala Trp Pro Glu Phe Phe Gly Ser Arg Lys Ala Leu Ala
65 70 75 80

Glu Lys Ala Val Arg Gly Leu Arg Arg Ala Arg Ala Ala Gly Val Arg
85 90 95

Thr	Ile	Val	Asp	Val	Ser	Thr	Phe	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp	Val	Ser	Leu	100	105	110	
Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Arg	Ala	Ala	Asp	Val	His	Ile	Val	Ala	Ala	Thr	115	120	125	
Gly	Leu	Trp	Phe	Asp	Pro	Pro	Leu	Ser	Met	Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	130	135	140	
Glu	Leu	Thr	Gln	Phe	Phe	Leu	Arg	Glu	Ile	Gln	Tyr	Gly	Ile	Glu	Asp	145	150	155	160
Thr	Gly	Ile	Arg	Ala	Gly	Ile	Ile	Lys	Val	Ala	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala	165	170	175	
Thr	Pro	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Leu	180	185	190	
Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Val	Thr	Thr	His	Thr	Ala	Ala	Ser	Gln	Arg	Asp	195	200	205	
Gly	Glu	Gln	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Glu	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	210	215	220	
Arg	Val	Cys	Ile	Gly	His	Ser	Asp	Asp	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	225	230	235	240
Thr	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ile	Gly	Leu	Asp	His	Ile	Pro	245	250	255	
His	Ser	Ala	Ile	Gly	Leu	Glu	Asp	Asn	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Leu	260	265	270	
Gly	Ile	Arg	Ser	Trp	Gln	Thr	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	Lys	Ala	Leu	Ile	275	280	285	
Asp	Gln	Gly	Tyr	Met	Lys	Gln	Ile	Leu	Val	Ser	Asn	Asp	Trp	Leu	Phe	290	295	300	
Gly	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Thr	Asn	Ile	Met	Asp	Val	Met	Asp	Arg	Val	305	310	315	320

Asn Pro Asp Gly Met Ala Phe Ile Pro Leu Arg Val Ile Pro Phe Leu
 325 330 335

Arg Glu Lys Gly Val Pro Gln Glu Thr Leu Ala Gly Ile Thr Val Thr
 340 345 350

Asn Pro Ala Arg Phe Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ala Ser
 355 360 365

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido purificado, el polipéptido que se selecciona de:
 - (i) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:2; o
 - (ii) un polipéptido que comprende una secuencia que es más del 95% idéntica a (i),
- 5 en donde el polipéptido es capaz de hidrolizar una molécula de organofosfato seleccionada del fosmet y el fentión.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido se selecciona de:
 - (i) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:1;
 - (ii) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:3; o
 - (iii) un polipéptido que comprende una secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:4.
- 10 3. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de organofosfato además se selecciona del grupo que consiste de: cumafos, coroxon, paraoxon, paratión, metil paratión, diazinon, clorpirifos, dMUP, DFP, dimetoato, malatión, y malaoxon.
4. Un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o la reivindicación 3, fusionado a al menos otra secuencia de polipéptidos.
- 15 5. El polipéptido de fusión de la reivindicación 4, en donde al menos otro polipéptido es una proteína de enlace de maltosa.
6. Un polinucleótido aislado, el polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de:
 - (i) una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:5;
 - (ii) una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:6;
 - 20 (iii) una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:7;
 - (iv) una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:8;
 - (v) una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; o
 - (vi) una secuencia que es al menos 90% idéntica a cualquiera de (i) a (v),
- 25 en donde el polinucleótido codifica un polipéptido capaz de hidrolizar una molécula de organofosfato seleccionada del fosmet y el fentión.
7. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6.
8. El vector de la reivindicación 7, el cual es un vector viral.
9. El vector de la reivindicación 7, el cual es un vector plásmido.
- 30 10. Una célula huésped no-humana que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
11. Un proceso de preparación de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el proceso que comprende el cultivo de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10, bajo condiciones que permiten la producción del polipéptido, y la recuperación del polipéptido.
- 35 12. Una composición para hidrolizar una molécula de organofosfato, la composición que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y uno o más portadores aceptables.

- 13.** Una composición para hidrolizar una molécula de organofosfato, la composición que comprende una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10, y uno o más portadores aceptables.
- 14.** Un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, el método que comprende la exposición de la muestra a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 5 **15.** El método de la reivindicación 14, en donde el polipéptido se proporciona como una composición de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13.
- 16.** El método de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, que además comprende la exposición de la muestra a un catión divalente.
- 17.** El método de la reivindicación 16, en donde el catión divalente es el zinc.
- 10 **18.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste de suelo, agua, material biológico, o una combinación de estos.
- 19.** Una planta transgénica que produce un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20.** Un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, el método que comprende la exposición de la muestra a una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 19.
- 15 **21.** Una cepa aislada de *Agrobacterium radiobacter* depositada bajo NM01/21112 el 20 de Abril 2001 en Laboratorios Analíticos del Gobierno Australiano.
- 22.** Una composición para hidrolizar una molécula de organofosfato, la composición que comprende la cepa *Agrobacterium radiobacter* de la reivindicación 21, y uno o más portadores aceptables.
- 20 **23.** Un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, el método que comprende la exposición de la muestra a una cepa *Agrobacterium radiobacter* de acuerdo con la reivindicación 21.
- 24.** Una espuma o esponja polimérica para hidrolizar una molécula de organofosfato, la espuma o esponja que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, inmovilizado sobre un soporte poroso polimérico.
- 25.** La espuma o esponja polimérica de la reivindicación 24, en donde el soporte poroso comprende poliuretano.
- 25 **26.** La espuma o esponja polimérica de la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en donde la esponja o espuma además comprende carbón incrustado o integrado sobre o en el soporte poroso.
- 27.** Un método para hidrolizar una molécula de organofosfato en una muestra, el método que comprende la exposición de la muestra a una esponja o espuma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26.
- 30 **28.** Un biosensor para detectar la presencia de un organofosfato, el biosensor que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un medio para detectar la hidrólisis de una molécula de organofosfato mediante el polipéptido.

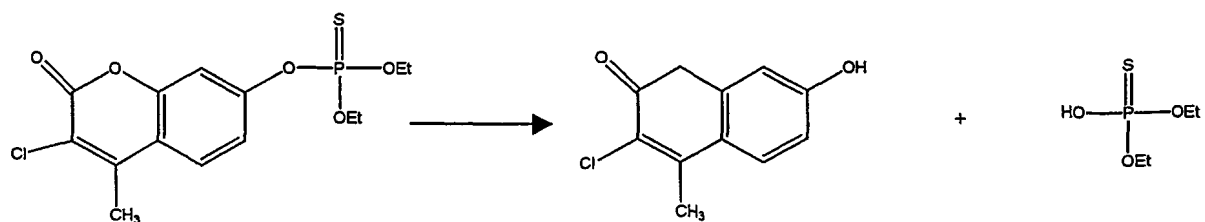


Figura 1

```

1  ATGCAAACGA GAAGAGATGC ACTTAAGTCT GCGGCCGCAA TAACTCTGCT
51  CGGCGGCTTG GCTGGGTGTG CAAGCATGGC CCGACCAATC GGTACAGGCG
101 ATCTGATTAA TACTGTTCGC GGCCCCATTC CAGTTTCGGA AGCGGGCTTC
151 AACTGACCC ATGAGCATAT CTGCGGCAGT TCGGCGGGAT TCCTACGTGC
201 GTGGCCGGAG TTTTTCGGTA GCCGCAAAGC TCTAGCGGAA AAGGCTGTGA
251 GAGGATTACG CCATGCCAGA TCGGCTGGCG TGCAAACCAT CGTCGATGTG
301 TCGACTTTCG ATATCGGTCG TGACGTCCGT TTATTGGCCG AAGTTTCGCG
351 GGCCGCCGAC GTGCATATCG TGGCGGCGAC TGGCTTATGG TTCGACCCGC
401 CACTTTC AAT GC GAATGCGC AGCGTCGAAG AACTGACCCA GTTCTTCCTG
451 CGTGAAATCC AACATGGCAT CGAAGACACC GGTATTAGGG CGGGCATTAT
501 CAAGGTCGCG ACCACAGGGA AGGCGACCCC CTTTCAAGAG TTGGTGTTAA
551 AGGCAGCCGC GCGGGCCAGC TTGGCCACCG GTGTTCCGGT AACCACCTCAC
601 ACGTCAGCAA GTCAGCGCGA TGGCGAGCAG CAGGCAGCCA TATTTGAATC
651 CGAAGGTTTG AGCCCCTCAC GGGTTTGTAT CGGTCACAGC GATGATACTG
701 ACGATTTGAG CTACCTAACC GGCCTCGCTG CGCGCGGATA CCTCGTCGGT
751 TTAGATCGCA TGCCGTACAG TGC GATTGGT CTAGAAGGCA ATGCGAGTGC
801 ATTAGCGCTC TTTGGTACTC GGTCGTGGCA AAC AAGGGCT CTCTTGATCA
851 AGGCGCTCAT CGACCGAGGC TACAAGGATC GAATCCTCGT CTCCCATGAC
901 TGGCTGTTCG GGTTTTTCGAG CTATGTCACG AACATCATGG ACGTAATGGA
951 TCGCATAAAC CCAGATGGAA TGGCCTTCGT CCCTCTGAGA GTGATCCCAT
1001 TCCTACGAGA GAAGGGCGTC CCGCCGAAA CGCTAGCAGG CGTAACCGTG
1051 GCCAATCCCG CGCGGTTCTT GTCACCGACC GTGCGGGCCG TCGTGACACG
1101 ATCTGAAACT TCCCGCCCTG CCGCGCCTAT TCCCGTCAA GATACCGAAC
1151 GATGA

```

Figura 2


```

1  MQTRRDALKS  AAAITLLGGL  AGCASMARPI  GTGDLINTVR  GPIPVSSEAGF
51  TLTHEHICGS  SAGFLRAWPE  FFGSRKALAE  KAVRGLRHAR  SAGVQTIVDV
101 STFDIGRDVR  LLAEVSRaad  VHIVAATGLW  FDPPLSMRMR  SVEELTQFFL
151 REIQHGIEDT  GIRAGIIKVA  TTGKATPFQE  LVLKAAARAS  LATGVPVTTH
201 TSASQRDGEQ  QAAIFESEGL  SPSRVCIGHS  DDTDDLsyLT  GLAARGYLVG
251 LDRMPYSAIG  LEGNASALAL  FGTRSWQTRA  LLIKALIDRG  YKDRILVSHD
301 WLEGFESSYVT  NIMDVMDRIN  PDGMAFVPLR  VIPFLREKGV  PPETLAGVTV
351 ANPARFLSPT  VRAVVTRSET  SRPAAPIPRQ  DTER

```

Figura 3

```

OPD   1  MQTRRVVLKSAAAAGTLLGGLAGCASVAGSIGTGDRINTVRGPITISEAG 50
      ||||| .||||| |||||:| .||||| |||||.:|||
OpdA  1  MQTRRDALKSAAAI . TLLGGLAGCASMARPIGTGDLINTVRGPIPVSEAG 49

OPD   51  FTLTHEHICGSSAGFLRAWPEFFGSRKALAEKAVRGLRRARAAGVRTIVD 100
      |||||:|.|||.|||
OpdA  50  FTLTHEHICGSSAGFLRAWPEFFGSRKALAEKAVRGLRHARSAGVQTIVD 99

OPD  101  VSTFDIGRDVSLLAEVSRADVHIVAATGLWFDPPPLSMRLRSVEELTQFF 150
      |||||:|||||
OpdA 100  VSTFDIGRDVRLLAEVSRADVHIVAATGLWFDPPPLSMRMRSVEELTQFF 149

OPD  151  LREIQYGIEDTGIRAGIISKVATTGKATPFQELVLKAAARASLATGVPVTT 200
      |||||.|||||
OpdA 150  LREIQHGIEDTGIRAGIISKVATTGKATPFQELVLKAAARASLATGVPVTT 199

OPD  201  HTAASQRDGEQQAAIFESEGLSPSRVCIGHSDDTDDLSTALAARGYLI 250
      ||.|||||:|||||:
OpdA 200  HTSASQRDGEQQAAIFESEGLSPSRVCIGHSDDTDDLSTGLAARGYLV 249

OPD  251  GLDHIHPSAIGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIKALIDQGYMKQILVSN 300
      |||:|.|||||:||| ||:|.|||||:|.||...|||:
OpdA 250  GLDRMPYSAIGLEGNASALALFGTRSWQTRALLIKALIDRGYKDRILVSH 299

OPD  301  DWLFGFSSYVTNIMDVMDRVNPDGMAFIPLRVIPFLREKGVPOETLAGIT 350
      |||||:|||||:|||||:|.|||||:
OpdA 300  DWLFGFSSYVTNIMDVMDRINPDGMAFVPLRVIPFLREKGVPPETLAGVT 349

OPD  351  VTNPARFLSPTLRAS 365
      |.|||||:|
OpdA 350  VANPARFLSPTVRVAVTRSETSRPAAPIRQDTER 384

```

Figura 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citadas en la descripción

- US 5484728 A [0003]
- US 5589386 A [0003]
- WO 9519440 A [0003] [0010]
- WO 9719176 A [0003] [0010]

- 10
- WO 9953037 A [0091]
 - WO 0064539 A [0100]
 - AU PR5023 [0151]

Literatura no-patente citada en la descripción

- **J. Perbal.** A Practical Guide to Molecular Cloning. John Wiley and Sons, 1984 [0065]
- 15
- **J. Sambrook et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 [0065]
 - Essential Molecular Biology: A Practical Approach. IRL Press, 1991, vol. 1, 2 [0065]
 - DNACloning: A Practical Approach. IRL Press, 1995, vol. 1-4 [0065]
 - Current Protocols in Molecular Biology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, 1988 [0065]
 - **Benning, M.M. ; Kuo, J.M. ; Raushel, F.M. ; Holden, H.M.** *Biochemistry*, 1995, vol. 34, 7973-7978 [0150]
- 20
- **Billecke, S.S. ; Primo-Parmo, S.L. ; Dunlop, C.S. ; Doorn, J.A. ; La Du, B.N. ; Broomfield, C.A.** *Chemico-Biological Interactions*, 1999, vol. 120, 251-256 [0150]
 - Mercury resistance transposon Tn813 mediates chromosome transfer in *Rhodopseudomonas sphaeroides* and intergeneric transfer in pBR322. **Bowen, A.R.StG. ; Pemberton, J.M.** *Plasmids in Bacteria*. Plenum Press, 1985, 105-115 [0150]
- 25
- **Broomfield, C.A. ; Lockridge, O. ; Millard, C.B.** *Chemico-Biological Interactions*, 1999, vol. 119-120, 413-418 [0150]
 - **Buchbinder, J.L. ; Stephenson, R.C. ; Dresser, M.J. ; Pitera, J.W. ; Scanlan, T.S. ; Fletterick, R.J.** *Biochemistry*, 1998, vol. 37, 5096-5160 [0150]
- 30
- **Campbell, P.M. ; Newcomb, R.D. ; Russell, R.J. ; Oakeshott, J.G.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, vol. 28, 139-150 [0150]
 - **Cheng, T. ; DeFrank, J.J. ; Rastogi, V.K.** *Chemico-Biological Interactions*, 1999, vol. 119-120, 455-462 [0150]
 - **Claudianos, C. ; Russell, R.J. ; Oakeshott, J.G.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, vol. 29, 675-686 [0150]
- 35
- **Cook, A.M. ; Daughton, C.G. ; Alexander, M.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, vol. 36, 668-672 [0150]

- Davies, J.A. ; Buchman, V.L. ; Krylova, O. ; Ninkina, N.N. *FEBS Letters*, 1997, vol. 410, 378-382 [0150]
- diSioudi, B. ; Grimsley, J.K. ; Lai, K. ; Wild, J.R. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, 2866-2872 [0150]
- Doom, J.A. ; Sorenson, R.C. ; Billecke, S.S. ; Hsu, C. ; La Du, B.N. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, vol. 120, 235-241 [0150]
- 5 • Dumas, D.P. ; Wild, J.R. ; Raushel, F.M. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1989, vol. 11, 235-243 [0150]
- Dumas, D.P. ; S.R. Caldwell ; J.R. Wild ; F.M. Raushel. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, 19659-19665 [0150]
- Dumas, D.P. ; Wild, J.R. ; Raushel, F.M. *Experientia*, 1990, vol. 46, 729-731 [0150]
- 10 • Gan, K.N. ; Smolen, A. ; Eckerson, H.W. ; Bert, N.L. *Drug Metabolism and Disposition*, 1991, vol. 19, 100-106 [0150]
- Gardiner, A.T. ; MacKenzie, R.C. ; Barrett, S.J. ; Kaiser, K. ; Cogdell, R.J. *Photosynthesis Research*, 1996, vol. 49, 223-235 [0150]
- Gill, S.C. ; von Hippel, P.H. *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 182, 319-326 [0150]
- 15 • Gordon, R.K. ; Feaster, S.R. ; Russell, A.J. ; LeJeune, K.E. ; Maxwell, M.D. ; Lenz, D.E. ; Ross, M. ; Doctor, B.P. *Chemical-Biological Interactions*, 1999, vol. 14, 463-470 [0150]
- Harcourt, R.L. ; Horne, I. ; Sutherland, T.D. ; Hammock, B.D. ; Russell, R.J. ; Oakeshott, J.G. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002, vol. 34, 263-268 [0150]
- Harper, L.L. ; McDaniel, S. ; Miller, C.E. ; Wild, J.R. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, vol. 54, 2586-2589 [0150]
- 20 • Hong, S.B. ; Raushel, F.M. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, vol. 120, 225-234 [0150]
- Hoskin, F.C.G. ; Walker, J.E. ; Mello, C.M. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, vol. 120, 399-404 [0150]
- Ibrahim, F.B. ; Cavagnol, J.C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1966, vol. 14, 369-371 [0150]
- Kovac, N. *Nature*, 1956, vol. 178, 703 [0150]
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Co, 1984 [0150]
- 25 • Lai, K. ; Stolowich, N.J. ; Wild, J.R. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, vol. 318, 59-64 [0150]
- 16S/23S rRNA sequencing. Lane, D.J. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, 1991, 115-175 [0150]
- LeJuene, K.E. ; Wild, J.R. ; Russell, A.J. *Nature*, 1998, vol. 395, 27-28 [0150]
- Mulbry, W.W. *Gene*, 1992, vol. 121, 149-153 [0150]
- 30 • Mulbry, W.W. ; Karns, J.S. *Journal of Bacteriology*, 1989, vol. 171, 6740-6746 [0150]
- Mulbry, W.W. ; Kearney, P.C. *Crop Protection*, 1991, vol. 10, 334-345 [0150]
- Munnecke, D.M. ; Hsieh, D.P. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, vol. 31, 63-69 [0150]
- Newcomb, R.D. ; Campbell, P.M. ; Ollis, D.L. ; Cheah, E. ; Russell, R.J. ; Oakeshott, J.G. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1997, vol. 94, 7464-7468 [0150]
- 35 • Pearson, W.R. ; D.J. Lipman. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0150]

- Petrikovics, I. ; Cheng, T.C. ; Papahadjopoulos, D. ; Hong, K. ; Yin, R. ; DeFrank, J.J. ; Jaing, J. ; Zong, Z.H. ; McGuinn, W.D. ; Sylvester, D. *Toxicology Science*, 2000, vol. 57, 16-21 [0150]
- Petrikovics, I. ; McGuinn, W.D. ; Sylvester, D. ; Yuzapavik, P. ; Jaing, J. ; Way, J.L. ; Papahadjopoulos, D. ; Hong, K. ; Yin, R. ; Cheng, T.C. *Drug Delivery*, 2000, vol. 7, 83-89 [0150]
- 5 • Rainey, F.A. ; M. Dorsch ; H.W. Morgan ; E. Stackebrandt. *Systematic and Applied Microbiology*, 1992, vol. 15, 197-202 [0150]
- Rekha, M. ; Thakur, M.S. ; Karanth, N.G. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2000, vol. 20, 213-235 [0150]
- Rosenberg, A. ; Alexander, M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, vol. 37, 886-891 [0150]
- Roth, M. *Methods of Biochemical Analysis*, 1969, vol. 17, 189-285 [0150]
- 10 • Sambrook ; Fritsch, J.E.F. ; Maniatis, T. *Molecular cloning - A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 [0150]
- Scanlen, C.S. ; Reid, R.C. *Chemistry and Biology*, 1995, vol. 2, 71-75 [0150]
- Serdar, C.M. ; Murdock, D.C. ; Rohde, M.F. *Bio/Technology*, 1989, vol. 7, 1151-1155 [0150]
- 15 • Sorenson, R.C. ; Primo-Parmo, S.L. ; Kuo, C-L ; Adkins, S. ; Lockridge, O ; La Du, B.N. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1995, vol. 92, 7187-7191 [0150]
- Wang, Q. ; Sun, M. ; Zhang, H. ; Huang, C. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 1998, vol. 12, 213-217 [0150]
- Wang, F. ; Xiao, M. ; Shaofeng, M. *Journal of Biochemistry and Toxicology*, 1993, vol. 8, 161-166 [0150]
- Yang, F. ; Wild, J.R. ; Russell, A.J. *Biotechnology Progress*, 1995, vol. 11, 471-474 [0150]
- 20 • Yanisch-Perron ; Vieira, C.J. ; Messing, J. *Gene*, 1985, vol. 33, 103-119 [0150]
- Zimmerer, R.P. ; Hamilton, R.H. ; Pootjes, C. *Journal of Bacteriology*, 1966, vol. 92, 746-750 [0150]