



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 383 077**

21 Número de solicitud: 201100907

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/72 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **22.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.06.2012

62 Número de la solicitud inicial: **P 201031714**

71 Solicitante/s: **Universidad Pablo de Olavide
Ctra. de Utrera, Km. 1 - Oficina de Transferencia
de Resultados
Edificio Francisco de Miranda nº 9
41013 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **Terrón González, Laura;
Limón Mortes, Cristina y
Santero Santurino, Eduardo**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **Sistemas de expresión heteróloga para el análisis funcional de bibliotecas metagenómicas.**

57 Resumen:

Sistemas de expresión heteróloga para el análisis funcional de bibliotecas metagenómicas.

La presente invención se relaciona con el desarrollo de unas células hospedadoras como sistemas de expresión que ofrecen la posibilidad de identificar genes de interés que no se expresan por ellos mismos en bacterias que albergan una biblioteca metagenómica, permitiendo así la detección de las funciones que codifican, que de lo contrario permanecerían silenciadas y sin detectar.

ES 2 383 077 A1

DESCRIPCIÓN

Sistemas de expresión heteróloga para el análisis funcional de bibliotecas metagenómicas.

5 Campo de la invención

La presente invención va dirigida al aislamiento de genes que codifican para funciones o actividades de interés. La invención se refiere a las áreas de la genética microbiana y la tecnología de ADN recombinante. Más específicamente, la invención se refiere a la combinación de elementos de diferentes circuitos reguladores de fagos y bacterias para construir vectores y cepas especializadas para su uso en el análisis funcional de bibliotecas metagenómicas.

Antecedentes de la invención

15 La metagenómica funcional o análisis metagenómico dirigido a la función ofrece la posibilidad de descubrir nuevas proteínas con funciones conocidas, nuevas proteínas con funciones novedosas, proteínas conocidas con funciones únicas y productos naturales novedosos que tienen actividades útiles en la medicina, agricultura o industria. Sin embargo, también es un reto encontrar la célula huésped que incluya todos los genes requeridos para expresar la función de interés y que exprese dicha función. El análisis según la función comienza con un examen amplio para identificar clones que expresan un rasgo deseado, seguido por la caracterización de los clones activos mediante análisis de secuencias y bioquímico. El éxito requiere la expresión fiel del gen o genes de interés y la secreción del producto génico, si el examen o ensayo requiere que sea extracelular.

25 La limitación significativa es que muchos genes, quizá la mayoría, no se expresarán en cualquier bacteria huésped particular seleccionada para la clonación. De hecho, existe una contradicción inherente en este enfoque ya que los genes se clonan a partir de organismos exóticos desconocidos para descubrir nuevos motivos en biología y sin embargo se requiere que estos genes se expresen en *Escherichia coli* u otra bacteria domesticada con el fin de que se detecten.

30 Es esencial desarrollar sistemas de expresión de genes heterólogos en las bacterias que albergan la biblioteca metagenómica con el fin de maximizar las posibilidades de expresar cualquier gen presente en la biblioteca metagenómica. Esto ampliará claramente el potencial de la metagenómica funcional.

35 La gran mayoría de los microorganismos en entornos naturales no pueden cultivarse. Por tanto, una enorme fuente de información genética sigue sin descubrirse incluso tras un examen extensivo basado en métodos de cultivo convencionales. Para explorar estas fuentes, se han desarrollado enfoques novedosos que implican el aislamiento y la clonación directos de ADN de muestras del entorno en vectores adecuados, creando así bibliotecas metagenómicas complejas.

40 Las bibliotecas metagenómicas pueden analizarse para determinar rutas y genes novedosos con técnicas basadas en secuencias o mediante análisis, que implican el examen de la actividad, de la expresión de rasgos fenotípicos novedosos en huéspedes sustitutos. La ventaja de tales enfoques de examen funcional es que pueden detectar actividades que se originan a partir de genes cuyas funciones no pueden predecirse mediante análisis bioinformáticos de secuencias de ADN o proteicas. Por otro lado, la identificación de actividades novedosas mediante examen funcional depende de la expresión satisfactoria de los genes clonados. La limitación significativa es que muchos genes, quizá la mayoría, no se expresarán en cualquier bacteria huésped particular seleccionada para la clonación. Incluso aunque se han expresado actividades novedosas usando *E. coli* como huésped, existe una ventaja potencial obvia de aumentar las posibilidades de expresión génica metagenómica en los huéspedes bacterianos para detectar capacidades de expresión adicionales.

50 Un enfoque para aumentar las posibilidades de expresión génica metagenómica consiste en clonar fragmentos de ADN metagenómico cortos de unas pocas kilobases de longitud en vectores de expresión que contienen un promotor cerca del sitio de clonación y cuya transcripción puede discurrir por el ADN metagenómico. Por tanto, la expresión génica se basa en la transcripción génica a partir del promotor de vector heterólogo. El principal inconveniente es que el ADN que va a expresarse no debe portar un terminador de la transcripción entre el promotor del vector y el gen de interés. Por tanto, las posibilidades de expresión génica metagenómica se correlacionan inversamente con el tamaño del ADN clonado. La reducción del tamaño de los fragmentos de ADN clonado en las bibliotecas metagenómicas implica que la probabilidad de tener un gen de interés en un clon se reduce también y, por tanto, se requieren un mayor número de clones metagenómicos para cubrir la misma longitud de ADN metagenómico total. Este enfoque ha sido satisfactorio para identificar actividades que pueden seleccionarse y dependen de la expresión de un único gen (Sommer *et al.*, 2009 Science 28, 325(5944): 1128-31) pero no parece ser adecuado para actividades que no pueden seleccionarse ya que requiere la obtención y el examen de un mayor número de clones metagenómicos. La limitación es incluso mayor cuando la actividad de interés requiere la expresión de más de un gen.

65 Los vectores más comunes usados para construir bibliotecas metagenómicas se basan en el factor sexual F de *E. coli*, que pueden mantener de manera estable grandes fragmentos de ADN. Estos vectores pueden ser vectores de tipo fósido, que pueden estar empaquetados en cabezas de fagos lambda, o BAC (cromosomas artificiales bacterianos) que albergan y mantienen fragmentos de ADN incluso mayores. La expresión de genes metagenómicos en esta clase de bibliotecas se basa en su propia capacidad de expresión en el huésped bacteriano.

El vector pCC1FOS es uno de los vectores tipo fósrido más común, usado para construir bibliotecas metagenómicas (casi 300 publicaciones usaron este vector en los últimos 5 años). Puede albergar aproximadamente 40 kb de ADN de inserto, que se empaquetan eficazmente en partículas lambda. Además del replicón F, el vector alberga un replicón adicional que proporciona un mayor número de copias que puede activarse haciendo crecer las bacterias con arabinosa. Esto es muy conveniente para amplificar la función o actividad de interés, lo que facilita su detección si el gen codificante se expresa en *E. coli*. Se han construido con diferentes grados de éxito varios vectores basados en F para permitir la transferencia y el mantenimiento de la biblioteca metagenómica entre diferentes bacterias huésped en un intento por aumentar las posibilidades de expresar un gen metagenómico en diferentes antecedentes bacterianos (Sosio *et al.*, 2000 Nature Biotechnol 18: 343-345; Martínez *et al.*, 2004 Appl. Environ. Microb. 70: 2452-2463; Hain *et al.*, 2008 Microb. 74: 1892-1901; Aakvik *et al.*, 2009 FEMS Microbiol Lett 296: 149-158). Sin embargo, la expresión de los genes metagenómicos todavía se basa en su propia capacidad de expresión en el huésped bacteriano.

Es esencial, por tanto, desarrollar nuevas herramientas biológicas basadas en la expresión génica heteróloga para aprovechar la metagenómica funcional potencial.

Compendio de la invención

Los inventores han desarrollado unos sistemas de expresión que, sorprendentemente, ofrecen la posibilidad de identificar genes de interés que no se expresan por ellos mismos en las bacterias que albergan la biblioteca metagenómica, permitiendo así la detección de las funciones que codifican, que de lo contrario permanecerían silenciadas y sin detectar. Esto da como resultado un mayor número de clones metagenómicos que presentan una función de interés particular para una biblioteca metagenómica dada.

Una ventaja adicional, proporcionada por el *gfp* carente de promotor en el vector, es que los sistemas reguladores desconocidos que responden a cualquier señal que puede actuar en las células de la invención pueden identificarse usando la tecnología SIGEX (Uchiyama *et al.*, 2005 Nat. Biotechnol. 23: 88-93).

Por tanto la presente invención facilita la expresión génica metagenómica permitiendo la identificación de las funciones de los genes por un lado y el uso adicional de un gen indicador que permite detectar sistemas reguladores metagenómicos que pueden actuar en la cepa huésped.

En un primer aspecto la invención se relaciona con el vector 1 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

- (a) un origen de transferencia de ADN,
- (b) un promotor T7, y
- (c) un sitio de clonación de ADN metagenómico.

En un segundo aspecto la invención se relaciona con el vector 2 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

- (a) un origen de transferencia de ADN,
- (b) un promotor regulable *psal*,
- (c) una secuencia que codifica para el sitio *nut_L*, y
- (d) un sitio de clonación de ADN metagenómico.

En un tercer aspecto la invención se relaciona con el vector 3 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

- (a) un origen de transferencia de ADN,
- (b) un promotor regulable *psal*,
- (c) una secuencia que codifica para el sitio *nut_L*,
- (d) un promotor T7, y
- (e) un sitio de clonación de ADN metagenómico.

ES 2 383 077 A1

En un aspecto adicional la invención se relaciona con la célula hospedadora 1 que comprende un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- i) un promotor *lacUV5*,
- ii) una secuencia del atenuador *nasF*, y
- iii) una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7,

y en donde el promotor está operativamente unido a la secuencia iii).

En otro aspecto adicional, la invención se relaciona con la célula hospedadora 2 que comprende:

- (a) un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- i) un promotor *lacUV5*,
 - ii) una secuencia del atenuador *nasF*, y
 - iii) una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7
- y en donde el promotor está operativamente unido a la secuencia iii); y

- (b) el vector 1 de la invención o el vector 3 de la invención, en donde dicho vector contiene además un ADN metagenómico en el sitio de clonación de ADN metagenómico operativamente unido al promotor T7 y en donde dicha célula permite la transcripción de ADN metagenómico desde el promotor T7 presente en dicho vector.

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con la célula hospedadora 3 que comprende un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- i) una secuencia del gen *nahR*,
- ii) un promotor *pnah*,
- iii) un promotor *psal*, y
- iv) una secuencia del gen N del fago lambda,

en donde el promotor ii) está operativamente unido a la secuencia i), el promotor iii) está operativamente unido a la secuencia iv) y en donde las secuencias i) y iv) se transcriben de manera divergente.

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con la célula hospedadora 4 que comprende:

- (a) un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- i) una secuencia del gen *nahR*,
- ii) un promotor *pnah*,
- iii) un promotor *psal*, y
- iv) una secuencia del gen N del fago lambda

en donde el promotor ii) está operativamente unido a la secuencia i), el promotor iii) está operativamente unido a la secuencia iv) y en donde las secuencias i) y iv) se transcriben de manera divergente; y

- (b) el vector 2 de la invención o el vector 3 de la invención, en donde dicho vector contiene además un ADN metagenómico en el sitio de clonación de ADN metagenómico operativamente unido al promotor *psal* y en donde dicha célula permite la transcripción del ADN metagenómico desde el promotor *psal* presente en dicho vector.

Asimismo la invención se refiere a un método para la expresión heteróloga de bibliotecas metagenómicas y analizar la función de genes que comprende el uso de los vectores y células de la invención.

En otro aspecto adicional la invención se refiere a un método de clonaje de ADN que comprende:

- (a) introducir el ADN en uno de los vectores 1 a 3 de la invención,
- 5 (b) introducir dicho vector de clonaje en una célula hospedadora inicial, preferiblemente en una bacteria,
- (c) cultivar dicha célula hospedadora, y
- 10 (d) transferir dicho ADN clonado a una o más células huéspedes secundarias.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere con un método para preparar una biblioteca de clones de ADN que comprende:

- 15 (a) introducir dicho ADN en uno de los vectores 1 a 3 de la invención,
- (b) introducir dicho vector en una primera célula hospedadora,
- 20 (c) cultivar dicha célula hospedadora para preparar la primera biblioteca de clones de ADN, y
- (d) transferir dicha primera biblioteca a una o más células huéspedes secundarias para preparar una o más bibliotecas secundarias.

25 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Fósmidos derivados de pCC1FOS. Para construir pMPO571 se añadió a pCC1FOS-CeuI un origen de transferencia de ADN mediante conjugación (*oriT*) y un promotor *psal* seguido por el sitio de utilización de la proteína antiterminadora N (sitio *nut*) del fago lambda adyacente al lado izquierdo del sitio de clonación de ADN metagenómico (*Eco72I*). Para construir pMPO579 se añadió a pMPO571 un gen *gfp* carente de promotor adyacente al lado derecho del sitio *Eco72I*.

Figura 2. Cepas derivadas de la cepa EPI300TM-T1^R de *E. coli*. MPO553: Cepa que produce ARN polimerasa de T7. MPO554: Cepa que produce proteína antiterminadora N y *NahR* (el activador del promotor *psal*). MPO555: Cepa que produce la proteína antiterminadora N truncada y *NahR*.

Figura 3. Expresión del gen *gfp* en la cepa EPI300TM-T1^R y MPO553 (la cepa que produce ARN polimerasa de T7), que albergan el fósido pMPO579, sin inducción y añadiendo arabinosa (aumenta el número de copias del fósido en estas cepas). La figura también muestra el nivel de expresión de GFP de la cepa MPO553 que alberga pMPO580 (similar a pMPO579 pero porta un terminador transcripcional entre el promotor de T7 y el gen *gfp*).

Figura 4. Expresión del gen *gfp* en la cepa MPO554 (la cepa que produce *NahR* y la proteína N) y MPO555 (similar a MPO554 pero con un desplazamiento del marco en el gen N), que albergan el fósido pMPO579.

Figura 5. Expresión del gen *gfp* en la cepa MPO554 (la cepa que produce *NahR* y proteína N) y MPO555 (similar a MPO554 pero con un desplazamiento del marco en el gen N), que albergan el fósido pMPO580 (similar a pMPO579 pero porta un terminador transcripcional entre el gen *psal* y el gen *gfp*).

Figura 6. Los 6 patrones de restricción diferentes de los fósidos que confieren resistencia a carbenicilina aislados de la biblioteca metagenómica. Los fósidos se digirieron con *Bam*HI, que realiza un corte en el fósido a ambos extremos del inserto (la banda de aproximadamente 9,5 kb es el fósido sin inserto).

55 Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado unos vectores y células que permiten expresar el ADN de una biblioteca metagenómica. En concreto tal y como se observa en el Ejemplo 7 de la presente invención, los vectores y células de la invención permiten identificar la función de genes de una biblioteca metagenómica.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante vector de la invención, seleccionado entre los vectores identificados como vectores 1, 2 y 3 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora que se describen a continuación.

Así, en una realización particular, el vector de la invención es un vector 1 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

ES 2 383 077 A1

- (a) un origen de transferencia de ADN,
- (b) un promotor T7, y
- (c) un sitio de clonación de ADN metagenómico.

5

En otra realización particular, el vector de la invención es el vector 2 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

10

- (a) un origen de transferencia de ADN,
- (b) un promotor regulable *psal*,
- (c) una secuencia que codifica para el sitio *nut_L*, y
- (d) un sitio de clonación de ADN metagenómico.

15

20

En otra realización particular el vector de la invención es el vector 3 para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

25

- (a) un origen de transferencia de ADN,
- (b) un promotor regulable *psal*,
- (c) una secuencia que codifica para el sitio *nut_L*,
- (d) un promotor T7, y
- (e) un sitio de clonación de ADN metagenómico.

30

35

El término “vector” se refiere a una construcción de ADN replicativo utilizado para expresar ADN. Los vectores de la invención son tipo fósmidos. Por “fósrido” según se emplea en la presente invención se refiere a un sistema de vector fagémido adecuado para el clonaje de insertos genómicos de aproximadamente 40 kilobases (kb). Los vectores de la invención son capaces de clonar insertos de 15, 20, 30 ó 40 kb o incluso más. Más particularmente, el vector es capaz de clonar largos insertos. Por “inserto” se refiere al ADN que se va a clonar. Por “insertos largos” según se emplea aquí se refiere a insertos de al menos 30 kb más particularmente 40, 50, 60 ó 70 kb.

40

Por “vector artificial” según se emplea en la presente invención incluye cualquier construcción artificial capaz de autoreplicarse, capaz de incluir insertos largos y capaz de mantenerse establemente en una célula huésped.

45

El vector de la invención contiene un gran número de funciones y características del vector pCC1FOSTM (EPICENTRE) entre ellos para, parB, parC, repe, oriV, ori2.

50

Por “replicación autónoma”, según se emplea en la presente invención se refiere a que dicho vector no se integra en el cromosoma de la célula huésped. En particular no se integra en ninguna célula huésped en donde se introduce dicho vector o al que es transferido. Dicho vector es capaz de auto replicarse en la célula hospedadora, por lo que el vector permanece presente cuando la bacteria crece y se divide. Más particularmente, el vector es capaz de ser mantenido establemente en la célula hospedadora. Así, el vector debe ser introducido en la célula huésped y mantenido en dicha célula durante su cultivo en repetidas generaciones (en al menos 2, 3, 4, 5, 6 ó 10 generaciones) o más generalmente durante el crecimiento de la célula huésped.

55

Los vectores de la invención pueden obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook *et al.*, “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

60

Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras seleccionables adecuadas para su uso en la identificación de células que se han transformado o transfectado o no con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican para proteínas que aumentan o disminuyen o bien su resistencia o bien su sensibilidad a antibióticos u otros compuestos (por ejemplo higromicina, kanamicina, etc.), genes que codifican para enzimas cuyas actividades pueden detectarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa, etc.) y genes que afectan de manera visible al fenotipo de las placas, las colonias, los huéspedes o las células transformadas o transfectadas tales como diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo proteína fluorescente verde, GFP, proteína fluorescente roja, dsRED). Alternativamente, los vectores de la presente invención pueden incorporar

65

ES 2 383 077 A1

un marcador de selección que no es un antibiótico, por ejemplo, genes que codifican para una enzima catabólica que permite el crecimiento en un medio que contiene un sustrato de dicha enzima catabólica como fuente de carbono. Un ejemplo de una enzima catabólica de este tipo incluye, pero no se limita a enzimas que codifican para la captación de lactosa y beta- galactosidasa. Otros marcadores de selección que proporcionan una ventaja metabólica incluyen, pero no se limitan a, enzimas para la utilización de galactosa, de sacarosa, de trehalosa y de xilosa.

Las “células hospedadoras” que pueden emplearse en la presente invención se describen más adelante.

Por “origen de transferencia” según se emplea aquí, se refiere a una secuencia de ADN necesaria para la transferencia de un plásmido bacteriano desde una bacteria huésped a una receptora durante el proceso de conjugación bacteriana.

Por “promotor” según se emplea en la presente invención, se entiende la región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una secuencia de ADN y por tanto es el lugar de enlace de la ARN polimerasa. Dicho promotor está compuesto por una secuencia específica de ADN localizado justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción de ADN y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula. El “promotor T7”, según se emplea aquí se refiere al promotor con secuencia (SEQ ID NO: 35).

Por “promotor regulable” se entiende a aquel promotor cuyo funcionamiento puede ser alterado en presencia o en ausencia de ciertos agentes. El promotor regulable *psal*, según se emplea en la presente invención, se refiere al promotor de secuencia SEQ ID NO: 24 que responde a salicilato, y en donde dicha secuencia comprende el sitio de reconocimiento del activador *NahR*.

Por “secuencia que codifica para el sitio *nut_L*” según se emplea en la presente invención se refiere a la región con secuencia de ADN (SEQ ID NO: 25) que permite el funcionamiento del sistema de antiterminación del fago lambda mediada por la proteína antiterminadora N, codificada por el gen N (SEQ ID NO: 34), en donde la región codificante está comprendida entre los nucleótidos 168 y 569.

Por “sitio de clonación de ADN metagenómico” según se emplea en la presente invención se refiere a la región de ADN que contiene sitios únicos de corte de enzimas de restricción para la clonación de ADN metagenómico. Por “clonación” o “clonaje” según se emplea aquí se refiere a la tecnología que permite aislar y propagar secuencias de interés.

Por “ADN metagenómico” según se emplea en la presente invención se refiere a las secuencias de nucleótidos que forman la metagenoteca.

Por “genoteca metagenómica”, “biblioteca metagenómica” o “metagenoteca” se refiere al conjunto de clones de fragmentos de ADN procedentes de una muestra. Dicho ADN puede proceder de una sola fuente o de una mezcla de fuentes, por ejemplo de una única muestra o de una mezcla de muestras. El origen de dicha muestra puede ser animal, vegetal, etc. Preferiblemente dicha muestra es de origen ambiental.

En una realización particular los vectores de la invención comprenden adicionalmente una secuencia de ADN metagenómico en el sitio de clonación de ADN metagenómico operativamente unido.

Por “operativamente unido” según se emplea en la presente invención significa que un promotor está en una localización funcional y orientación correcta en relación a la secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio transcripcional y/o expresión de esa secuencia, es decir está bajo el control de dicho promotor.

En otra realización particular el origen de transferencia de ADN de los vectores de la invención es el *oriT* del plásmido RP4 (SEQ ID NO: 23).

En otra realización particular los vectores de la invención comprenden adicionalmente un gen reportero.

Por “gen reportero” según se emplea en la presente invención se entiende un gen cuyo producto da lugar a una señal que puede ser fácilmente medible o detectado.

En una realización adicional el gen reportero de los vectores de la invención es el gen de *gfp*. Dicha secuencia *gfp* puede contener además la Shine Dalgarno del gen-10 del fago T7 (SEQ ID NO: 26).

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, en adelante célula hospedadora de la invención seleccionada entre las células hospedadoras identificadas como célula hospedadora 1, 2, 3 y 4.

En una realización particular, la célula hospedadora de la invención es una célula hospedadora 1 que comprende un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- i) un promotor *lacUV5*,

ES 2 383 077 A1

- ii) una secuencia del atenuador *nasF*, y
- iii) una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7,

5 y en donde el promotor está operativamente unido a la secuencia iii).

En otra realización adicional la invención se relaciona con una célula hospedadora 2, que comprende

- 10 (a) un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende
 - i) un promotor *lacUV5*,
 - 15 ii) una secuencia del atenuador *nasF*, y
 - iii) una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7y en donde el promotor está operativamente unido a la secuencia iii); y
- 20 (b) un vector 1 o un vector 3 de la invención, en donde dicho vector contiene además un ADN metagenómico en el sitio de clonación de ADN metagenómico operativamente unido al promotor T7 y en donde dicha célula permite la transcripción de ADN metagenómico desde el promotor T7 presente en dicho vector.

25 Dicha célula hospedadora 1 y 2 tiene reducido el nivel de expresión del gen de la ARN polimerasa de T7. En una realización particular dicha célula hospedadora 1 y 2 carece del represor transcripcional LacI.

30 Por “célula que tiene reducido el nivel de expresión del gen de la ARN polimerasa del fago T7” se refiere a una célula en la que el nivel de expresión del gen de ARN polimerasa del fago T7 está disminuido al menos 1,5%, al menos 2%, al menos 4%, al menos 8% y más preferiblemente al menos un 10% o incluso más con respecto al nivel de expresión de la célula silvestre.

Por “promotor *lacUV5*” se refiere al promotor con secuencia SEQ ID NO: 29.

35 Por “secuencia del atenuador *nasF*” (SEQ ID NO: 30) según se emplea aquí se refiere a una secuencia de nucleótidos que reducen los niveles basales de expresión de un gen. De acuerdo con la presente invención, se considera que los niveles de expresión de un gen están reducidos cuando los niveles de dicha expresión respecto a la expresión basal están disminuidos al menos un 1,5%, al menos un 2%, al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%:
40 al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 110%, al menos un 120%, al menos un 130%, al menos un 140%, al menos un 150% o más.

45 Por “gen-1 del fago T7”, en una realización particular (SEQ ID NO: 31), según se emplea en la presente invención se refiere al gen que codifica para la ARN polimerasa de T7, en donde la región codificante está comprendida entre los nucleótidos 24 y 2675 de dicha secuencia.

En otra realización particular, la célula hospedadora es una célula hospedadora 3 que comprende un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- 50 i) una secuencia del gen *nahR*,
- ii) un promotor *p_{nah}*,
- 55 iii) un promotor *p_{sal}*, y
- iv) una secuencia del gen N del fago lambda

60 en donde el promotor ii) está operativamente unido a la secuencia i), el promotor iii) está operativamente unido a la secuencia iv) y en donde las secuencias i) y iv) se transcriben de manera divergente.

En otra realización particular, la célula hospedadora es una célula hospedadora 4 que comprende

- 65 (a) un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende
 - i) una secuencia del gen *nahR*,

ii) un promotor *pnah*,

iii) un promotor *psal*, y

5 iv) una secuencia del gen N del fago lambda

en donde el promotor ii) está operativamente unido a la secuencia i), el promotor iii) está operativamente unido a la secuencia iv) y en donde las secuencias i) y iv) se transcriben de manera divergente, y

10 (b) un vector 2 o un vector 3 de la invención, en donde dicho vector contiene además un ADN metagenómico en el sitio de clonación de ADN metagenómico operativamente unido al promotor y en donde dicha célula permite la transcripción del ADN metagenómico desde el promotor *psal* presente en dicho vector.

15 Por “gen *nahR*”, según se emplea en la presente invención, se refiere al gen de secuencia SEQ ID NO: 32 que codifica el activador del promotor *psal* y activa la transcripción a partir del promotor *psal* en presencia del salicilato inductor.

Por “*pnah*” se refiere al promotor cuya secuencia está comprendida en la SEQ ID NO: 33.

20 Por “gen N del fago lambda”, según se emplea en la presente invención, se refiere a la secuencia SEQ ID NO: 34 que codifica para la proteína antiterminadora N de manera que en presencia de dicha proteína, la transcripción iniciada desde *psal* puede continuar insensible a las posibles señales terminadoras que pueda encontrarse en el ADN metagenómico, gracias a la antiterminación mediada por la proteína N. La región codificante de dicho gen se encuentra entre los nucleótidos 168 y 569 de SEQ ID NO: 34.

En una realización particular las células hospedadoras de la invención son células bacterianas.

30 Las células hospedadoras de la invención pueden contener múltiples copias de los vectores de la invención tras ser cultivadas en presencia de arabinosa, por ejemplo mediante la adición al medio de cultivo de arabinosa 1 mM durante 6 horas. De esta manera se consigue mejorar la capacidad de detección de las funciones de los genes de la biblioteca metagenómica.

35 Para la obtención de las células hospedadoras de la invención que comprenden adicionalmente los vectores de la invención es necesario introducir uno de los vectores de la invención que comprenden el ADN metagenómico. Dicha introducción puede realizarse mediante diversos métodos, por ejemplo mediante conjugación triparenteral según se describe en Figurski y Helinski, 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(4): 1648-52 empleando las células hospedadoras de la invención como receptoras, una cepa portadora de dichos vectores, por ejemplo EPI300TM-T1^R y una cepa auxiliar, por ejemplo DH5 α portadora del plásmido auxiliar pRK2013.

40 Las células hospedadoras de la invención incluyen una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Bacterias gram negativas adecuadas comprenden, entre otras, el género de bacterias entéricas, *Escherichia* sp, *Salmonella* sp, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp y *Yersinia* y no entéricas incluyendo *Azotobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Xanthomonas* sp.

45 En una realización particular dichas células bacterianas pertenecen a la especie *Escherichia coli*.

50 Una cepa de *E. coli* adecuada para la realización de la presente invención es la cepa F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ -rpsL nupG trfA tonA dhfr].

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para la expresión heteróloga de bibliotecas metagenómicas y analizar la función de genes que comprende el uso de los vectores y células hospedadoras de la invención.

55 Por “expresión heteróloga” según se emplea en la presente invención se refiere a la expresión de una secuencia que no pertenece al organismo receptor sino a uno diferente.

En otro aspecto adicional la invención se refiere a un método de clonaje de ADN que comprende:

60 (a) introducir el ADN en uno de los vectores 1 a 3 de la invención,

(b) introducir dicho vector de clonaje en una célula hospedadora inicial, preferiblemente en una bacteria,

(c) cultivar dicha célula hospedadora, y

65 (d) transferir dicho ADN clonado a una o más células huéspedes secundarias.

ES 2 383 077 A1

En otro aspecto adicional, la invención se refiere con un método para preparar una biblioteca de clones de ADN que comprende:

- (a) introducir dicho ADN en uno de los vectores 1 a 3 de la invención,
- (b) introducir dicho vector en una primera célula hospedadora,
- (c) cultivar dicha célula hospedadora para preparar la primera biblioteca de clones de ADN, y
- (d) transferir dicha primera biblioteca a una o más células huéspedes secundarias para preparar una o más bibliotecas secundarias.

La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

Ejemplos

20 *Materiales y métodos*

Construcciones de ADN

Las extracciones del ADN necesario para las clonaciones se realizaron con el kit para extracción de ADN plasmídico NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando la estirpe era EPI300-T1^R a los inóculos para la extracción del material genético se les añadió arabinosa 1 mM para aumentar el número de copias del fósido y obtener así mayor cantidad de ADN.

Para hacer los extremos de ADN romos cuando fue necesario se empleó Klenow o T4 DNA Polimerasa (según cada caso, indicado en el texto, ambas de Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para llevar a cabo las reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 DNA Ligase (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de las ligaciones en las que el vector era el fósido se transformó en la estirpe EPI300-T1^R mediante electroporación [Sambrook *et al.*, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3]. Los pasos intermedios en los que el vector fue pBluescript II SK+ se transformaron en la estirpe de *E. coli* DH5 α competentes mediante transformación por choque térmico [Sambrook *et al.*, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

Amplificación de la polimerasa en cadena (PCR)

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, empleando unos 3 ng del ADN molde, y concentraciones finales de ambos cebadores 1 μ M, dNTPs a 200 μ M y MgCl₂ a 3 mM. La enzima usada fue Expand High Fidelity PCR System (Roche). Una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C fue seguida de 35 ciclos de amplificación (30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C), y una extensión final de 7 min a 72°C.

50 Ejemplo 1

Construcción del vector 3 de la invención

El principal objetivo era conseguir que los genes de las metagenotecas pudieran ser expresados heterológamente desde el vector que se utiliza para construir la metagenoteca. Ello permitiría detectar funciones de interés en las metagenotecas con mucha más frecuencia que si se utilizase el producto que ahora se comercializa, el pCC1FOSTM.

Las ventajas que ofrecía pCC1FOSTM eran las siguientes:

- 1.- La metagenoteca construida con este vector se mantiene muy establemente en *E. coli*, siendo el número de copias del vector en condiciones normales de 1 por cada célula.
- 2.- Se puede inducir el n° de copias en la estirpe EPI300TM-T1^R, lo que mejora la capacidad de detección de actividades al incrementar la dosis génica.
- 3.- Tiene un promotor dependiente de la polimerasa de T7 que puede utilizarse para transcribir heterológamente los genes que se clonen durante la construcción de una metagenoteca.

ES 2 383 077 A1

Pero tiene dos problemas:

- 1.- El vector no es transmisible por conjugación y, por tanto, la metagenoteca construida con este vector no puede transferirse a otras cepas bacterianas para detectar actividades.
- 2.- Los genes han de transcribirse desde sus propios promotores, por ello si un promotor determinado no se expresa en *E. coli*, la función del gen que se transcribe desde ese promotor no puede detectarse.

Para soslayar estos dos problemas se han realizado una serie de modificaciones en el vector y se han construido dos estirpes bacterianas especializadas para usar junto con el vector modificado.

Las modificaciones que se han realizado en el vector pCC1FOS son:

- 1.- Se ha incorporado un origen de transferencia *oriT* del plásmido RP4 (SEQ ID NO: 23). Se trata de un pequeño fragmento de ADN de 314 bp. Ello permite que las metagenotecas construidas en este vector puedan ser transferidas eficazmente por conjugación entre diferentes especies de enterobacterias mediante conjugaciones triparenterales, usando una cepa convencional que alberga un plásmido auxiliar tales como pRK2013 o pRK2073 (Figurski y *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(4): 1648-52).
- 2.- Se ha incorporado un sistema de expresión heteróloga que permite la transcripción del ADN metagenómico clonado en el vector desde uno de los extremos. Consiste en 1a. incorporación de un promotor regulable *Psal* que incluye el sitio de reconocimiento del activador *NahR* (SEQ ID NO: 24), desde el que se puede inducir la transcripción en respuesta a la presencia del inductor salicilato, en una cepa adecuada que contenga el sistema de regulación de este promotor (ver más adelante).
- 3.- A continuación del promotor se ha clonado un sitio *nut_L* (SEQ ID NO: 25) que permite el funcionamiento del sistema de antiterminación del fago lambda mediada por la proteína antiterminadora N. En una cepa adecuada que contenga el gen codificante de la proteína N, la transcripción iniciada desde *psal* puede continuar insensible a las posibles señales terminadoras que pueda encontrarse en el ADN metagenómico, gracias a la antiterminación mediada por la proteína N.
- 4.- Una de las variantes del vector modificado tiene tras el sitio de clonación del ADN metagenómico un gen reportero codificante de GFP la proteína verde fluorescente, que incluye la Shine Dalgarno del gen-10 del fago T7 (SEQ ID NO: 26). Esto, por una parte, va a permitir estudiar el comportamiento del vector para validar las mejoras realizadas. Por otra parte, va a permitir detectar sistemas de regulación que pueda haber en las metagenotecas construidas, que respondan a una molécula determinada. Poder identificar sistemas de regulación desconocidos presentes en las metagenotecas y que respondan a determinadas moléculas de interés, puede ser muy útil para desarrollar biosensores que detecten esa molécula.

Para la construcción del vector pMPO579, se realizó una primera construcción del vector pMPO571.

1.1. Construcción del vector pMPO571

Se partió de una modificación previa del vector tipo fósido pCC1FOSTM (EPICENTRE), que contenía dos sitios *CeuI* que flanquean el sitio de clonación para el ADN metagenómico (*Eco72I*). Para obtener este vector se clonó en pCC1FOSTM linealizado con *Eco72I* un fragmento en doble cadena (SEQ ID NO: 28) que contiene un nuevo sitio *Eco72I* (ya que el anterior quedaba inutilizado) y un sitio *CeuI* a cada lado del nuevo sitio *Eco72I*. La incorporación de estas dianas permitía la separación del fragmento de ADN metagenómico completo clonado en el vector del resto del vector). A continuación se modificó este fósido introduciendo varios elementos.

En primer lugar, se clonó un origen de transferencia de ADN mediante conjugación, en concreto el *oriT* del plásmido RP4 (SEQ ID NO: 23), en el sitio *HpaI* único de pCC1FOS-*CeuI*, generando pMPO561. Se amplificó el *oriT* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del plásmido RP4 usando los cebadores *oriTHpaIFw* (SEQ ID NO: 1) y *OriTHpaIRev* (SEQ ID NO: 2) introduciendo un sitio de restricción *HpaI* en cada extremo del fragmento de ADN amplificado.

Posteriormente, se introdujo un promotor *psal* (SEQ ID NO: 24) seguido por el sitio *nut_L* (SEQ ID NO: 25) (sitio de utilización de N hacia la izquierda) del fago lambda. Se sintetizó la secuencia que contenía estos dos elementos mediante PCR recursiva (Prodromou y Pearl, 1992 Protein Eng. 5(8):827-9), usando los cebadores *psalnut1* (SEQ ID NO: 3), *psalnut2* (SEQ ID NO: 4), *psalnut3* (SEQ ID NO: 5) y *psalnut4* (SEQ ID NO: 6). Se clonó este fragmento en primer lugar en el sitio *EcoRV* del sitio de clonación múltiple de pBluescript II SK+. Después se obtuvo el fragmento de interés digiriendo con *XbaI* más *HindIII* y se clonó en el sitio *NarI* único de pMPO561, dando lugar al vector llamado pMPO571. Un transformante que tenía la orientación apropiada del fragmento *psal-nut_L* en relación con el sitio de clonación de ADN metagenómico, se seleccionó y se nombró como pMPO571 (Figura 1).

ES 2 383 077 A1

1.2. Construcción del vector pMPO579

Una modificación adicional al fósido pMPO571 consistió en la adición de un gen *gfp* carente de promotor con la Shine-Dalgarno del gen-10 del fago T7 (SEQ ID NO: 26) cerca del sitio de clonación de ADN metagenómico. Para obtener esta construcción fueron necesarias varias etapas.

En primer lugar, se amplificó parte del fósido pCC1FOS-CeuI que contenía el gen de resistencia a cloranfenicol y parte de redF, usando los cebadores HindChIFw (SEQ ID NO: 7) y BstZredFRv (SEQ ID NO: 8) (fragmento flanqueado por los sitios HindIII y Bst1107I) y se clonó este fragmento en el sitio EcoRV del sitio de clonación múltiple de pBluescript II SK+ (plásmido intermedio 1).

A continuación, se obtuvo la región codificante del gen *gfp* (SEQ ID NO: 27) a partir del plásmido pMPO634 (Tomás-Gallardo *et al.*, 2009 Microbial Biotechnology 2 (2 SPEC. ISS.): 262-273). El gen *gfp* tiene un sitio Eco72I (el mismo que el sitio de clonación para el ADN metagenómico en el fósido), que se mutó en un sitio MluI mediante PCR solapante (Ho *et al.*, 1989 Gene 77: 51-59) sin cambiar la secuencia de aminoácidos del gen codificante. Se amplificó el gen *gfp* resultante a partir del plásmido pMPO634 usando los cebadores KpnISDpT77GFP (SEQ ID NO: 9), GFPMluIFwsolap (SEQ ID NO: 11), GFPMluIRvsolap (SEQ ID NO: 10) y GFPXbaI-TFB-PCRsolap (SEQ ID NO: 12). El extremo 5' del cebador KpnISDpT77GFP (SEQ ID NO: 9) contenía la secuencia Shine-Dalgarno del gen-10 del fago T7 de tal manera que se ubicó durante la PCR a la distancia correcta en el sentido de 5' de la región codificante de *gfp* amplificada. Se digirió el producto de la PCR con las enzimas de restricción KpnI y XbaI (sus sitios de restricción están en los extremos del fragmento), se hicieron romos sus extremos con la ADN polimerasa de T4 y se clonó entre los dos sitios HindIII del plásmido intermedio 1, cerca del gen de resistencia a cloranfenicol. Tras esta clonación se obtuvo la siguiente construcción en el vector pBluescript II SK+: Shine-Dalgarno de T7, *gfp* sin sitio Eco72I, gen resistente a cloranfenicol y parte de redF (plásmido intermedio 2).

Por último, se extrajo la construcción de interés del plásmido intermedio 2 con XhoI y ScaI (Shine-Dalgarno de T7, *gfp* sin sitio Eco72I y parte del gen de resistencia a cloranfenicol) y se clonó en el fósido pMPO571 en el sentido 3' del sitio de clonación de ADN metagenómico, entre los sitios HindIII y ScaI (esta digestión doble elimina parte del gen de resistencia a cloranfenicol del fósido), obteniendo el fósido final pMPO579 (Figura 1), con el gen de resistencia a cloranfenicol regenerado.

Ejemplo 2

Cepas de la invención

Para conseguir la mejora de la funcionalidad del vector pMPO579 era necesario construir cepas bacterianas que permitieran la transcripción desde el promotor de T7 (ya existente en pCC1FOS) y desde el promotor *psal* acoplado al sistema de antiterminación (introducido en el vector 2 y 3 de la invención). Para ello se construyeron dos cepas bacterianas que promovían la transcripción desde estos promotores heterólogos presentes en dichos vectores.

2.1. Construcción de la cepa MPO553

La cepa MPO553 es una variante de EPI300TM-T1^R que ha integrado en su genoma en el locus *trg* un fragmento de ADN que porta el promotor *lacUV5* (SEQ ID NO: 29), *nasF* (SEQ ID NO: 30) y el gen-1 del fago T7 (SEQ ID NO: 31) y que expresa a bajo nivel el gen de la ARN polimerasa del fago T7. Esta cepa carece del represor transcripcional LacI por lo que la transcripción a partir de *placUV5* es constitutiva. Sin embargo, la mayor parte de la transcripción iniciada en *placUV5* termina en el atenuador *nasF* y sólo una pequeña fracción transcribe el gen 1 de T7.

Esta cepa, además de permitir incrementar el número de copias del plásmido, como su parental, tiene la ARN polimerasa del fago T7 además de su ARN polimerasa y, por tanto, en esa bacteria se puede transcribir el ADN metagenómico desde el promotor T7 presente en el vector. La ARN polimerasa de T7 es mucho más rápida que la ARN polimerasa bacteriana y es insensible a muchos de los terminadores de la transcripción bacterianos, permitiendo así la transcripción del ADN metagenómico.

Para su construcción, se ha usado la cepa EPI300TM-T1^R de *E. coli* [F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG trfA tonA dhfr] (EPICENTRE). La construcción se integró en el locus *trg*, reemplazando su secuencia codificante a través de una modificación del método descrito por Datsenko y Wanner, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5.

Para la generación del fragmento de ADN, en primer lugar se obtuvo el promotor *placUV5* (SEQ ID NO: 29) como un fragmento de EcoRI-BamHI a partir del plásmido pNK736 (Simons *et al.*, 1983 Cell 34(2): 673-82) y se clonó en pBluescript II SK+ digerido con NotI y BamHI, para construir pMPO556. Se obtuvo el atenuador *nasF* (SEQ ID NO: 30) a partir de pMPO27 flanqueado por los sitios EcoRI (Royo *et al.*, 2005 Nucleic Acids Research 33(19): e169) y se clonó en pMPO556 digerido con EcoRI, generando de ese modo pMPO557. Se amplificó el gen que codifica para la resistencia a kanamicina a partir de pKD4 (Datsenko y Wanner, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5) usando los cebadores Sac-P1 (SEQ ID NO: 18) y Sac-P2 (SEQ ID NO: 19) y se clonó en pMPO557 digerido con EcoRV, generando así pMPO558.

ES 2 383 077 A1

Para construir la segunda parte de la construcción, se amplificó el gen que codifica para la resistencia a cloranfenicol a partir de pKD3 usando los cebadores Sac-P1 (SEQ ID NO: 18) y Sac-P2 (SEQ ID NO: 19) y se clonó en pGP1-2 (Tabor y Richardson, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1074-1078) digerido con BamHI, tras el gen-1 (ARN polimerasa de T7) (SEQ ID NO: 31), generando pMPO559.

5

Se creó la construcción de interés en dos partes porque la construcción completa era demasiado grande para amplificarse mediante la misma reacción de PCR.

La primera parte de la construcción, en pMPO558, se amplificó mediante PCR usando los cebadores trgEc-P12 (SEQ ID NO: 13) y trgEc-BSK2 (SEQ ID NO: 14). Los extremos 5' de estos cebadores son homólogos a los límites de la secuencia genómica que va a reemplazarse por la construcción amplificada. Se digirió el producto de PCR con DpnI y se introdujo mediante electroporación en la cepa EPI300TM-T1^R que contenía pKD46 para integrar la primera parte de la construcción en el locus trg (Datsenko y Wanner, 2000 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5).

La segunda parte de la construcción, en pMPO559, se amplificó mediante PCR usando los cebadores trgEc-P12 (SEQ ID NO: 13) y terSacP2-G1 (SEQ ID NO: 15). Los extremos 5' de estos cebadores son homólogos a los límites de la secuencia genómica que va a reemplazarse por la construcción amplificada. Se digirió el producto de PCR con DpnI y se introdujo mediante electroporación en la cepa EPI300TM-T1^R con la primera parte de la construcción que contenía pKD46 para integrar la segunda parte de la construcción tras la primera (reemplazando el gen de resistencia a kanamicina de pKD4) (Datsenko y Wanner, 2000 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5).

Finalmente, se eliminó el gen resistente a cloranfenicol del genoma usando pCP20 (Datsenko y Wanner, 2000 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5).

En la figura 2 se muestra un esquema de la integración genómica en la cepa MPO553, que porta el promotor *lacUV5* (SEQ ID NO: 29), el atenuador *nasF* (SEQ ID NO: 30) y el gen-1 del fago T7 (SEQ ID NO: 31). La orientación de esta construcción es la opuesta a la orientación del gen trg.

2.2. Construcción de las cepas MPO554 y MPO555

La cepa MPO554 ha integrado en su genoma en el locus trg un fragmento de ADN que porta el gen *nahR* (SEQ ID NO: 32) y los promotores *pnah* y *psal* (SEQ ID NO: 33) que transcriben de manera divergente, seguido del gen N del fago lambda (SEQ ID NO: 34). *NahR* codifica el activador del promotor *psal* y activa la transcripción a partir del promotor *psal* en presencia del salicilato inductor, induciendo así la producción de la proteína antiterminadora N. A su vez, *NahR* activa la transcripción a partir del promotor *psal* presente en el fósido pMPO579 y la proteína N impide la terminación de la transcripción que discurre por el sitio nut al ADN metagenómico.

Para la construcción de las cepas MPO554 y MPO555, se utilizó la cepa EPI300TM-T1^R de *E. coli* [F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG trfA tonA dhfr] (EPICENTRE).

Para construir la cepa MPO554 se obtuvo el fragmento que contenía el gen *nahR* (SEQ ID NO: 32) con su promotor *pnah* y el promotor *psal* (SEQ ID NO: 33) cercano al mismo pero transcritos de manera divergente, a partir del vector pCNB4-S2 (Cebolla, A. *et al.*, 2001 Nucleic Acids Research Vol. 29 No. 3 759-766) mediante restricción con NotI y BamHI y se clonó en pBluescript II KS+ digerido con las mismas enzimas de restricción, generando así pMPO563. Se amplificó el gen que codifica para la resistencia a cloranfenicol a partir de pKD3 (Datsenko y Wanner, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5) usando los cebadores Sac-P1 (SEQ ID NO: 18) y Sac-P2 (SEQ ID NO: 19) y se clonó en pMPO563 digerido con EcoRV, seleccionando la misma orientación que el gen *nahR* (SEQ ID NO: 32), generando pMPO564. Entonces, se amplificó el gen N a partir de ADN de lambda usando los cebadores NotN (SEQ ID NO: 20) y KspN (SEQ ID NO: 21). Se digirió el producto de PCR con las enzimas de restricción NotI y KspI (sus sitios de restricción están en los extremos del fragmento) y se clonó en pMPO564 parcialmente digerido con KspI y completamente digerido con NotI (de esta manera, el vector sólo perdía un pequeño fragmento fuera de la construcción de interés), generando de este modo pMPO565, que tiene el gen N en el sentido de 3' de *psal* y en la misma orientación.

A continuación se amplificó la construcción en pMPO565 mediante PCR usando los cebadores trgEc-BKS (SEQ ID NO: 16) y trgEc-P1 (SEQ ID NO: 17). Los extremos 5' de estos cebadores son homólogos a los límites de la secuencia genómica que va a reemplazarse por la construcción amplificada. Se digirió el producto de PCR con DpnI y se introdujo mediante electroporación en la cepa EPI300TM-T1^R que contenía pKD46 para integrar la construcción en el locus trg (Datsenko y Wanner, 2000 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5).

Finalmente, se eliminó el gen de resistencia a cloranfenicol del genoma usando pCP20 (Datsenko y Wanner, 2000 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12): 6640-5).

65

En la Figura 2 se muestra un esquema de la integración genómica en la cepa MPO554, que porta el gen *nahR* (SEQ ID NO: 32), el promotor *psal* cerca del mismo pero transcrito de manera divergente y el gen N del fago lambda en el sentido de 3' de *psal*. La orientación de *psal*-genN es la opuesta a la del gen trg.

Como control para la validación de los ensayos empleando el vector y las cepas de la invención, se generó la cepa MPO555, a partir de la misma cepa EPI300TM-T1^R de *E. coli* que en casos anteriores. Para la generación del fragmento de ADN que iba a ser introducido, se hibridó el cebador thnB-6-thnC (SEQ ID NO: 22) consigo mismo incubándolo durante 5 minutos a 85°C más 30 minutos a temperatura ambiente y se rellenó en el inserto hibridado con Klenow para crear un inserto de 14 pb. Se clonó este inserto en pMPO565 digerido con HpaI para generar un desplazamiento del marco en el codón 60 del gen N. El plásmido resultante era pMPO575.

La construcción de la cepa MPO555 era muy similar a la de MPO554. La única diferencia era que el molde para la PCR con los cebadores trgEc-BKS (SEQ ID NO: 16) y trgEc-P1 (SEQ ID NO: 17) era pMPO575 en lugar de pMPO565.

En la Figura 2 se muestra un esquema de la integración genómica en la cepa MPO555, que es similar a la de en la cepa MPO554 pero el gen N tiene un desplazamiento del marco que lo hace inútil.

Ejemplo 3

Transferencia de vectores mediante conjugación

La presencia de *oriT* en los vectores modificados debe permitir una transferencia eficaz de los vectores entre diferentes cepas de *E. coli* mediante conjugación. Con el fin de someter a prueba la eficacia de conjugación, se realizaron conjugaciones triparentales durante la noche (Figurski y Helinski, 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(4): 1648-52) usando EPI300TM-T1^R que portaba los vectores como la cepa donadora, mutantes espontáneos resistentes a rifampicina (Rif^r) o ácido nalidíxico (Nal^r) derivados de EPI300TM-T1^R como las cepas receptoras y DH5 α que portaba el plásmido auxiliar pRK2013 como la cepa auxiliar de conjugación.

Se estimaron las frecuencias de conjugación como la razón de clones transconjugantes de la cepa receptora (clones resistentes a cloranfenicol+rifampicina o resistentes a cloranfenicol+ácido nalidíxico) con respecto a los clones totales de la cepa receptora (o bien resistentes a rifampicina o bien a ácido nalidíxico, dependiendo de la cepa receptora). Los vectores que portaban *oriT* se transfirieron de manera muy eficaz a la cepa receptora (frecuencia de conjugación superior a 10⁻¹) con una frecuencia similar o incluso mayor que la del plásmido móvil bien conocido pBBR1 MCS-3 (frecuencia de conjugación de 10⁻¹), mientras que el plásmido pCC1FOS-CeuI no pudo transferirse mediante conjugación (frecuencia de conjugación de <10⁻⁷).

La alta frecuencia de conjugación, superior al 10%, permitiría transferir millones de clones independientes a la cepa receptora en un conjugación triparental convencional, garantizando así la transferencia de cada clon de bibliotecas metagenómicas que contienen algunos cientos de miles de clones a la cepa receptora, cuando se usa toda la biblioteca metagenómica como cultivo donador.

Ejemplo 4

Transcripción a partir del promotor de T7 y a partir del promotor psal a través de un terminador de transcripción

Se sometieron a prueba los niveles de transcripción de los promotores heterólogos presentes en los vectores modificados en el vector pMPO579, que contiene el gen *gfp* carente de promotor clonado en el sentido de 3' del sitio de clonación metagenómico (véase la Figura 1) y por tanto puede usarse como gen indicador. Los niveles de fluorescencia de las diferentes cepas que albergan el plásmido indicarán la magnitud de la transcripción que discurre por el sitio de clonación de ADN metagenómico al gen *gfp*.

Con el fin de someter a prueba si la transcripción iniciada en los promotores heterólogos podría realizarse a través de terminadores de transcripción, se construyó el plásmido pMPO580. Este plásmido se deriva de pMPO579 y tiene un fragmento de ADN de 2,5 kb que porta el terminador de transcripción del gen *thnL* de la cepa TFA de *Sphingomonas macrogotitabida* (López-Sánchez *et al*, 2009 Appl. Environ. Microbiol. 76(1): 110-8) clonado en el sitio *Eco*72I.

La expresión del gen *gfp* en la cepa EPI300TM-T1^R/pMPO579 es muy baja (aproximadamente 1.300 U.F., similar a la fluorescencia intrínseca de EPI300TM-T1^R) y el aumento del número de copias del plásmido añadiendo arabinosa 1 mM durante 6 horas no dio como resultado un aumento sustancial de la expresión (Figura 3). En la cepa especializada MPO553, que produce de manera constitutiva niveles bajos de ARN polimerasa de T7, los niveles de expresión también eran muy bajos cuando el número de copias del plásmido era bajo. Sin embargo, los niveles de expresión aumentaban drásticamente cuando se aumentaba el número de copias del plásmido mediante la adición de arabinosa. Este resultado mostró claramente que el promotor de T7 en pMPO579 era funcional y podría dirigir la transcripción del ADN metagenómico clonado en este vector y que la cepa especializada MPO553 producía ARN polimerasa de T7. El nivel de expresión de *gfp* del plásmido pMPO580, que contenía el terminador *thnL*, era incluso superior que el de pMPO579, lo que indicaba que este terminador no puede terminar la transcripción mediante la ARN polimerasa de T7 desde el promotor de T7 (Figura 3).

En la cepa especializada que producía el activador transcripcional *NahR* y la proteína antiterminación N, MPO554, el nivel basal de expresión de *gfp* a partir de pMPO579 era también bajo. El aumento del número de copias del plásmido añadiendo arabinosa aumentó los niveles de expresión sólo 2 veces. Se observaba un aumento moderado similar en los niveles de expresión cuando *NahR* activaba la transcripción en presencia de salicilato 5 mM durante 6 horas. Sin embargo, se obtenían niveles de expresión altos cuando se añadía tanto arabinosa como salicilato al medio de cultivo (Figura 4). Este resultado indicaba que el promotor *psal* en pMPO579 es funcional y podría dirigir la transcripción del ADN metagenómico clonado en este vector y que la cepa especializada MPO554 producía el activador transcripcional *NahR* requerido para la transcripción a partir de *psal*.

Para demostrar la antiterminación de la transcripción mediante la proteína N, se construyó la cepa MPO555. Esta cepa es isogénica con MPO554, siendo la única diferencia que MPO555 portaba un desplazamiento del marco en el codón 60 del gen N. Por tanto, la activación transcripcional mediante *NahR* debería mantenerse en esta cepa mientras que la antiterminación de la transcripción mediante la proteína N debería desaparecer.

Los niveles de expresión de *gfp* a partir de pMPO579 en esta cepa eran ligeramente menores que los de la cepa MPO554 (Figura 4), indicando así que la transcripción a partir de *psal* podía inducirse en esta cepa. En la cepa que producía la proteína N, la expresión a partir de pMPO580, que portaba el terminador transcripcional entre el promotor *psal* y el gen *gfp* (SEQ ID NO: 26), era alta de manera similar. Sin embargo, la expresión de *gfp* a partir de pMPO580 no podía inducirse en la cepa MPO555, que carecía de la proteína N (Figura 5). Este resultado indicaba claramente que la transcripción a partir de *psal* en pMPO580 se terminaba antes de alcanzar el gen *gfp*, presumiblemente en el terminador del gen *thnL* ubicado aproximadamente a 2,3 kb en el sentido de 3' del inicio de transcripción desde *psal*, pero que la transcripción podía discurrir por *gfp* si también se inducía la producción de la proteína antiterminadora mediante salicilato (en la cepa MPO554).

Ejemplo 5

Identificación de sistemas reguladores mediante la tecnología SIGEX

Se realizó una reconstrucción de la tecnología SIGEX (Uchiyama *et al.*, 2005 Nat. Biotechnol. 23: 88-93) mediante la cual los clones que portan sistemas reguladores del ADN metagenómico que responden a una señal particular pueden identificarse inicialmente mediante examen usando citometría de flujo, para estimar si el fósido pMPO579 era adecuado para esta tecnología ya que la transcripción del gen *gfp* diferencial a partir de este vector puede discriminarse mediante citometría de flujo.

Con este propósito, se hicieron crecer cultivos en LB de MPO554 Rif^r y MPO554 Nal^r que portaban el plásmido pMPO579 y posteriormente se diluyeron en dos cultivos similares de LB que contenía arabinosa 1 mM para aumentar el número de copias del plásmido. También se añadió salicilato 5 mM al cultivo de MPO554 Nal^r/pMPO579. Tras 16 horas de incubación se mezclaron ambos cultivos a diferentes razones (1:1, 1 Nal^r:10⁴ Rif^r y 1 Nal^r:10⁵ Rif^r). Se sometieron los cultivos mezclados a citometría de flujo y se separaron las bacterias que expresaban altos niveles de GFP y se sembraron en placa de LB con cloranfenicol para un análisis adicional. Se hicieron crecer las colonias resultantes en LB con rifampicina y en LB con ácido nalidíxico para someter a prueba su resistencia a estos antibióticos. De esta manera, pudieron establecerse las razones de bacterias inducidas frente a no inducidas que podían recuperarse tras la separación y compararlas con las que se fijaron inicialmente mediante dilución. En la mezcla con una razón 1 Nal^r:1 Rif^r, prácticamente todas las bacterias recuperadas tras la separación eran Nal^r (inducidas); con la razón 1 Nal^r:10⁴ Rif^r la proporción de bacterias inducidas aumentó desde el 0,01% hasta aproximadamente el 30% tras la separación; finalmente, con la razón 1 Nal^r:10⁵ Rif^r esta proporción aumentó desde el 0,001% hasta aproximadamente el 15% tras la separación. En resumen, la cepa inducida se había enriquecido 10⁴ veces tras la separación (tabla 1). Estos resultados indicaban que las bibliotecas metagenómicas construidas en el fósido pMPO579 podían usarse para identificar sistemas reguladores metagenómicos que responden a un inductor particular usando la tecnología SIGEX.

TABLA 1

Incremento de la proporción de bacterias inducidas analizadas por citometría de flujo, comenzando con un cultivo mezcla con MPO554/pMPO579 inducida (cepa derivada de NaI^r) y MPO554/pMPO579 no inducida (Rif^r) en cocientes diferentes (1:1, 1:10,000 y 1:100,000, siempre la cepa inducida es la minoritaria

MPO554 NaI ^r / pMPO579 : MPO554 Rif ^r / pMPO579	Cociente antes de la separación celular	Cociente después de la separación celular
1:1	50%	100%
1:10,000	0.01%	30%
1:100,000	0.001%	15%

Ejemplo 6

Construcción de una biblioteca metagenómica en la cepa EPI300TM-T1^R

Las modificaciones introducidas en los vectores y las cepas especializadas debían permitir la expresión de ADN metagenómico, permitiendo así la identificación de clones con actividades de interés que de lo contrario permanecerían sin detectar. Para validar el rendimiento aumentado de los vectores y las cepas modificados mostrando que su uso permitía el aislamiento de un mayor número de clones con las características deseadas, se usó el plásmido pMPO579 para construir una biblioteca metagenómica procedente de una costa contaminada con petróleo crudo en Punta San García, Cádiz, España, debido a un vertido de petróleo de un barco.

Se aisló el ADN de la muestra tal como anteriormente se ha descrito. Se extrajeron las bacterias mediante adición directa de tampón de ruptura (NaCl 0,2 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) a la muestra y mezclando durante la noche con agitación. Entonces, se centrifugó a velocidad baja (400 g durante 3 minutos) y se vertió el sobrenadante sobre una disolución de la resina Nycodenz (1,3 g ml⁻¹). La centrifugación en un gradiente de la resina Nycodenz (Axis-Shield) permitía enriquecer la biomasa microbiana. La centrifugación se llevó a cabo a 10.000 g x durante 40 minutos a 4°C. Podía observarse una banda blanquecina que contenía células bacterianas en la superficie de contacto entre la resina Nycodenz y la fase acuosa. Se recuperó esta banda y se mezcló con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se sedimentaron las células mediante centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos y se resuspendieron en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

Después de esto, se extrajo el ADN con el kit GENOME DNA (MP Biomedicals). Usando este método, se obtuvieron 24 µg de ADN a partir de 160 g de suelo, con un tamaño promedio de aproximadamente 40 kb.

Para construir la biblioteca metagenómica a partir del ADN aislado, se siguió el protocolo del kit de producción de bibliotecas de fósidos CopyControlTM (EPICENTRE), empleando el fósido pMPO579 en lugar de pCC1FOS.

Para preparar pMPO579, se linealizó mediante restricción con la enzima PmlI (New England Biolabs, isoesquizómero de *Eco72I*), se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba (USB) y se concentró con un dispositivo de filtrado con centrifugación (Microcon, Millipore).

La biblioteca metagenómica construida comprendía aproximadamente 2 Gigabases distribuidas en aproximadamente 54.000 clones diferentes y se mantenía en la cepa EPI300TM-T1^R.

Ejemplo 7

Identificación de clones resistentes a carbenicilina

Se transfirió la biblioteca metagenómica mediante conjugación con derivados imitantes espontáneos resistentes a ácido nalidíxico y rifampicina de las cepas EPI300TM-T1^R, MPO553 y MPO554.

Conjugaciones triparentales durante la noche usando EPI300TM-T1^R que albergaba toda la biblioteca metagenómica como cultivo donador, cada uno de los derivados resistentes a ácido nalidíxico y rifampicina como cepas receptoras y DH5α/pRK2013 como cepa auxiliar, dieron como resultado una frecuencia de conjugación muy alta, siempre superior al 6%, independientemente de la cepa receptora. Estos datos indicaban que los clones metagenómicos podían transferirse a otras cepas con una frecuencia similar al vector original pMPO579, a pesar de las aproximadamente 40 kb de ADN metagenómico que porta cada clon.

Los microorganismos cultivados han sido la fuente de casi todos los genes de resistencia a antibióticos caracterizados; por tanto, se conoce poco acerca de las reservas ambientales de genes de resistencia y su contribución a la resistencia en entornos clínicos. Los antibióticos β -lactámicos se encuentran entre los antibióticos prescritos con mayor frecuencia para seres humanos y ganado, generando una presión de selección potente para los genes que codifican para elementos de resistencia en entornos próximos a la actividad humana. También se predice que las β -lactamasas son abundantes en los suelos incluso en ausencia de presión de selección antropogénica, porque el suelo es rico en microorganismos que producen antibióticos de β -lactama, tales como penicilinas y cefalosporinas, y ya se han detectado β -lactamasas en bibliotecas metagenómicas procedentes del intestino humano y procedente de reservas ambientales.

Resultaba interesante estimar la abundancia de estos genes de resistencia en los suelos y cuántos de estos genes de resistencia no podían detectarse en bibliotecas metagenómicas convencionales usando vectores tipo fósido. Por tanto, se eligió la resistencia al antibiótico β -lactámico carbenicilina como la actividad de interés para identificar entre los clones metagenómicos transferidos. Además, la actividad podía seleccionarse directamente en placas de LB que contenían 100 mg/l de carbenicilina, lo que facilitaba la validación del procedimiento.

También se sembraron conjugaciones triparentales en placas de LB con ácido nalidíxico/rifampicina para seleccionar la cepa receptora, más cloranfenicol para seleccionar la transferencia de los clones, carbenicilina para seleccionar clones que conferían a la cepa receptora resistencia a este antibiótico y arabinosa para aumentar el número de copias del fósido. La tabla 2 muestra el número de clones resistentes a carbenicilina (Cb^r) detectados por cada millón de transconjugantes que habían recibido un clon metagenómico, cuando se usaban como receptoras las cepas especializadas o derivadas de la cepa EPI300TM-T1^R convencional que permitían la expresión heteróloga bien a partir del promotor de T7 o bien a partir del promotor *psal*. Se obtuvo un número aproximadamente 6 veces mayor de transconjugantes resistentes a carbenicilina con las cepas especializadas en comparación con la cepa EPB00TM-T1^R convencional. Además, en el caso de MPO554, este aumento dependía de la adición de salicilato 1 mM, que inducía la activación de la transcripción a partir de *psal* por *NahR* y la antiterminación por parte de la proteína N.

TABLA 2

Número de clones resistentes a carbenicilina detectados en las diferentes cepas por cada millón de transconjugantes

	EPI300 TM -T1 ^R	MPO553	MPO554	
			- salicilato	+ salicilato
Cepas derivadas de Rif ^R	-	64	-	28
Cepas derivadas de Nal ^R	12	60	15	67

Se analizó el patrón de restricción de los fósidos que conferían resistencia a carbenicilina presentes en 100 transconjugantes, 10 de EPI300TM-T1^R, 40 de MPO553 y 50 de MPO554. Se aislaron un total de 6 fósidos diferentes (Figura 6). Todos los transconjugantes de EPI300TM-T1^R Cb^r tenían el mismo fósido, ETN1. Este fósido también se encontró entre los transconjugantes derivados de las cepas especializadas. El uso de MPO553, la cepa que produce ARN polimerasa de T7, permitió la identificación de 3 fósidos adicionales, TN2, TN3 y TN4. Estos fósidos también se identificaron entre los transconjugantes derivados de MPO554, la cepa especializada que permitía la antiterminación de N. Esta cepa permitió la identificación de dos fósidos adicionales, N5 y N6, que no se identificaron usando las demás cepas.

Para confirmar la capacidad de cada fósido para conferir Cb^r a cada una de las cepas receptoras, se transfirieron los seis fósidos de vuelta a la cepa EPI300TM-T1^R Rif^r y al derivado EPI300TM-T1^R Nal^r. Se usaron cultivos de estas cepas que albergaban cada uno de los seis fósidos como donadores en conjugaciones triparentales junto con las cepas receptoras Nal^r y Rif^r y la cepa auxiliar DH5 α /PRK2013.

TABLA 3

Frecuencia de transconjugantes resistentes a carbenicilina (bacterias resistentes a carbenicilina/transconjugantes que han recibido el clon), para cada clon en cada cepa

		Receptores			
		EPI300 TM -T1 ^R Rif ^R	MPO553 Rif ^R	MPO554 Rif ^R	
				-salicilato	+salicilato
Donador: EPI300 TM - T1 ^R Nal ^R	ETN1	10 ⁻⁵	1	10 ⁻⁵	0.8
	TN2	<10 ⁻⁵	0.8	<10 ⁻⁵	1
	TN3	10 ⁻⁵	0.8	<10 ⁻⁵	1
	TN4	<10 ⁻⁵	1	<10 ⁻⁵	0.9
	N5	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	1
	N6	<10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	0.9
		EPI300-T1 ^R Nal ^R	MPO553 Nal ^R	MPO554 Nal ^R	
				-salicilato	+salicilato
Donador: EPI300 TM - T1 ^R Rif ^R	ETN1	0.1	7·10 ⁻²	0.3	0.5
	TN2	<10 ⁻⁵	5·10 ⁻²	<10 ⁻⁵	1
	TN3	<10 ⁻⁵	0.2	<10 ⁻⁵	1
	TN4	<10 ⁻⁵	0.2	<10 ⁻⁵	0.9
	N5	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	0.2	1
	N6	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	0.7

Tal como se muestra en la tabla 3, los seis fósmidos se transfirieron eficazmente a cada una de las 3 cepas receptoras. Sólo el fósido ETN1 confirió Cb^r a EPI300TM-T1^R Nal^R. La expresión del gen que confería resistencia a carbenicilina estaba aparentemente limitada ya que sólo una fracción de los transconjugantes mostraba resistencia y podía generar una colonia. Los plásmidos ETN1, TN2, TN3 y TN4 proporcionaron Cb^r a la cepa MPO553 que producía ARN polimerasa de T7 y todos ellos confirieron Cb^r a la cepa MPO554. Estos resultados, usando los fósidos aislados, estaban totalmente de acuerdo con los obtenidos usando toda la biblioteca metagenómica y mostraban claramente que al menos seis fósidos de la biblioteca codificaban potencialmente para genes de resistencia a carbenicilina, tal como se identificaba en las cepas especializadas permitiendo la expresión heteróloga del ADN metagenómico. Sin embargo, sólo una pequeña fracción (uno de seis) de los fósidos expresaron realmente el gen de resistencia por sí mismos y confirieron Cb^r en la cepa EPI300TM-T1^R.

Por tanto, estos resultados mostraban el potencial de usar la expresión heteróloga para detectar clones de fósidos que contienen genes con funciones de interés.

REIVINDICACIONES

5 1. Una célula hospedadora, que comprende un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- 10 i) un promotor *lacUV5*,
- ii) una secuencia del atenuador *nasF*, y
- 10 iii) una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7,

y en donde el promotor está operativamente unido a la secuencia iii).

15 2. Una célula hospedadora, que comprende

(a) un fragmento de ADN insertado en su genoma en donde dicho fragmento comprende

- 20 i) un promotor *lacUV5*,
- ii) una secuencia del atenuador *nasF*, y
- 25 iii) una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7,

y en donde el promotor está operativamente unido a la secuencia iii); y

(b) un vector para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

- 30 - un origen de transferencia de ADN,
- un promotor T7, y
- 35 - un sitio de clonación de ADN metagenómico;

o

40 un vector para el clonaje de ADN en una célula hospedadora, en donde dicho vector de clonaje es un vector artificial que se replica autónomamente en el interior de dicha célula hospedadora, que comprende:

- 45 - un origen de transferencia de ADN,
- un promotor regulable *psal*,
- una secuencia que codifica para el sitio *nut_L*,
- 50 - un promotor T7, y
- un sitio de clonación de ADN metagenómico,

55 en donde dicho vector contiene además un ADN metagenómico en el sitio de clonación de ADN metagenómico operativamente unido al promotor T7 y en donde dicha célula permite la transcripción de ADN metagenómico desde el promotor T7 presente en dicho vector.

60 3. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que carece del represor transcripcional LacI.

4. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha célula es una bacteria.

5. Célula según la reivindicación 4, en donde dicha bacteria es *Escherichia coli*.

65 6. Método para la expresión heteróloga de bibliotecas metagenómicas y analizar la función de genes que comprende el uso de una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

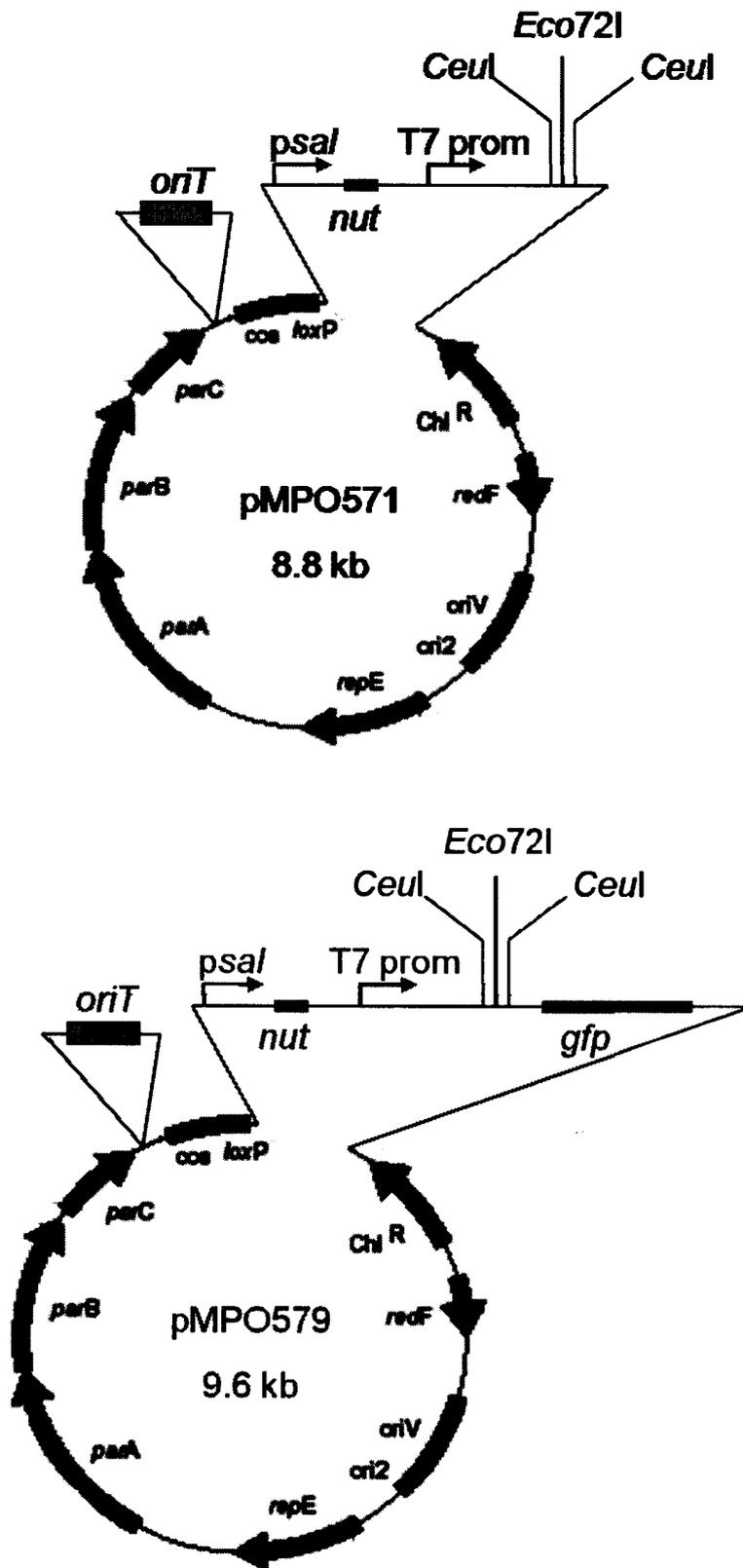


FIGURA 1

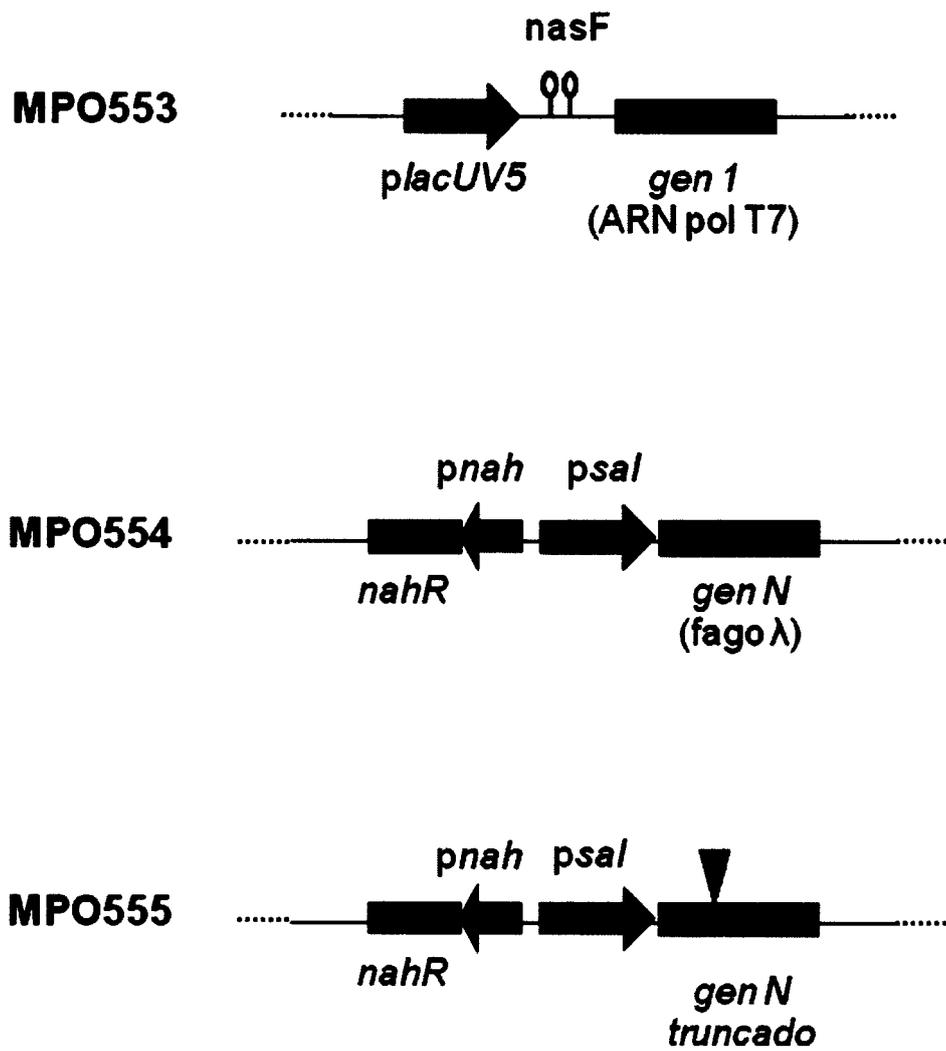


FIGURA 2

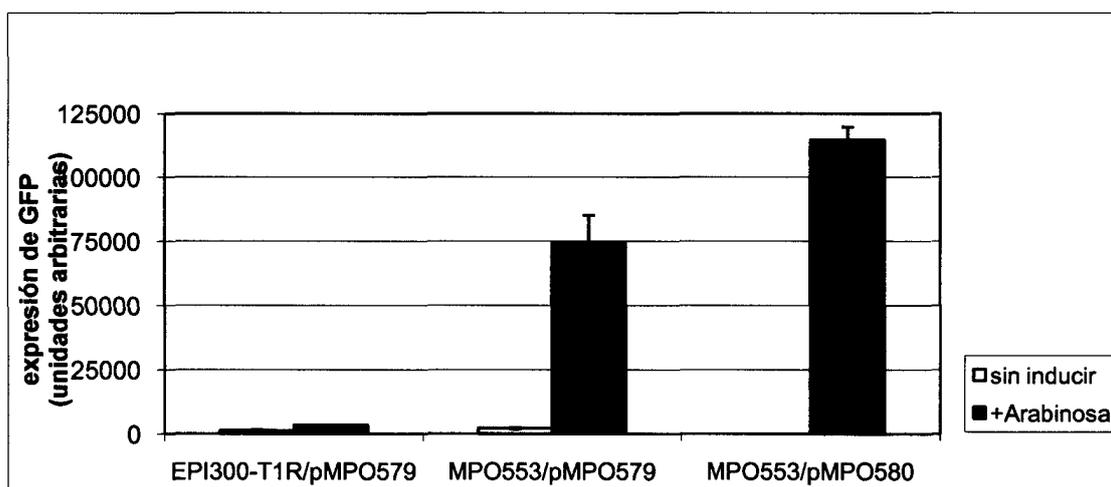


FIGURA 3

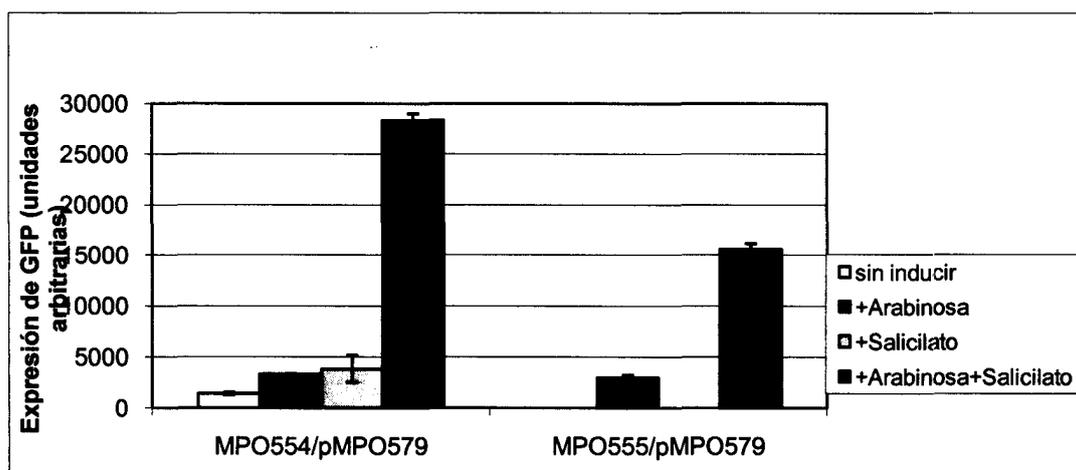


FIGURA 4

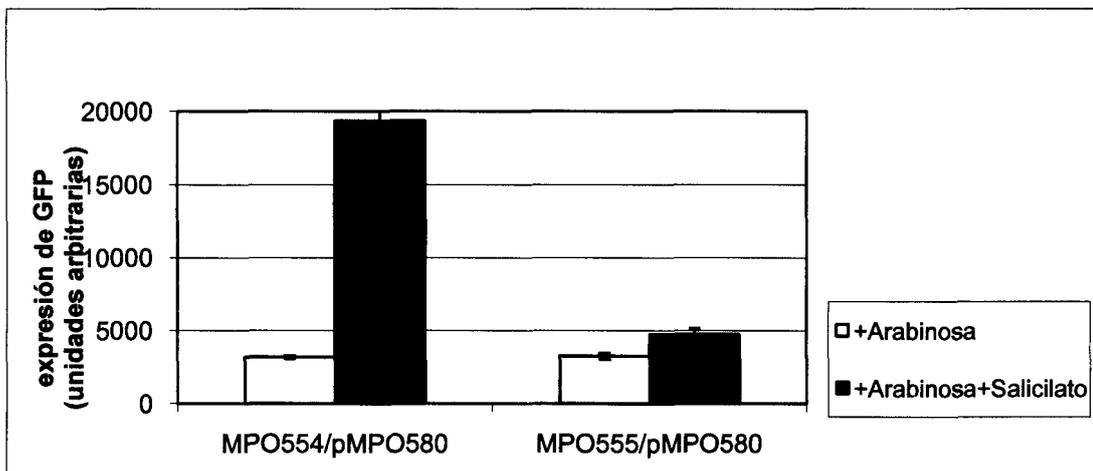


FIGURA 5

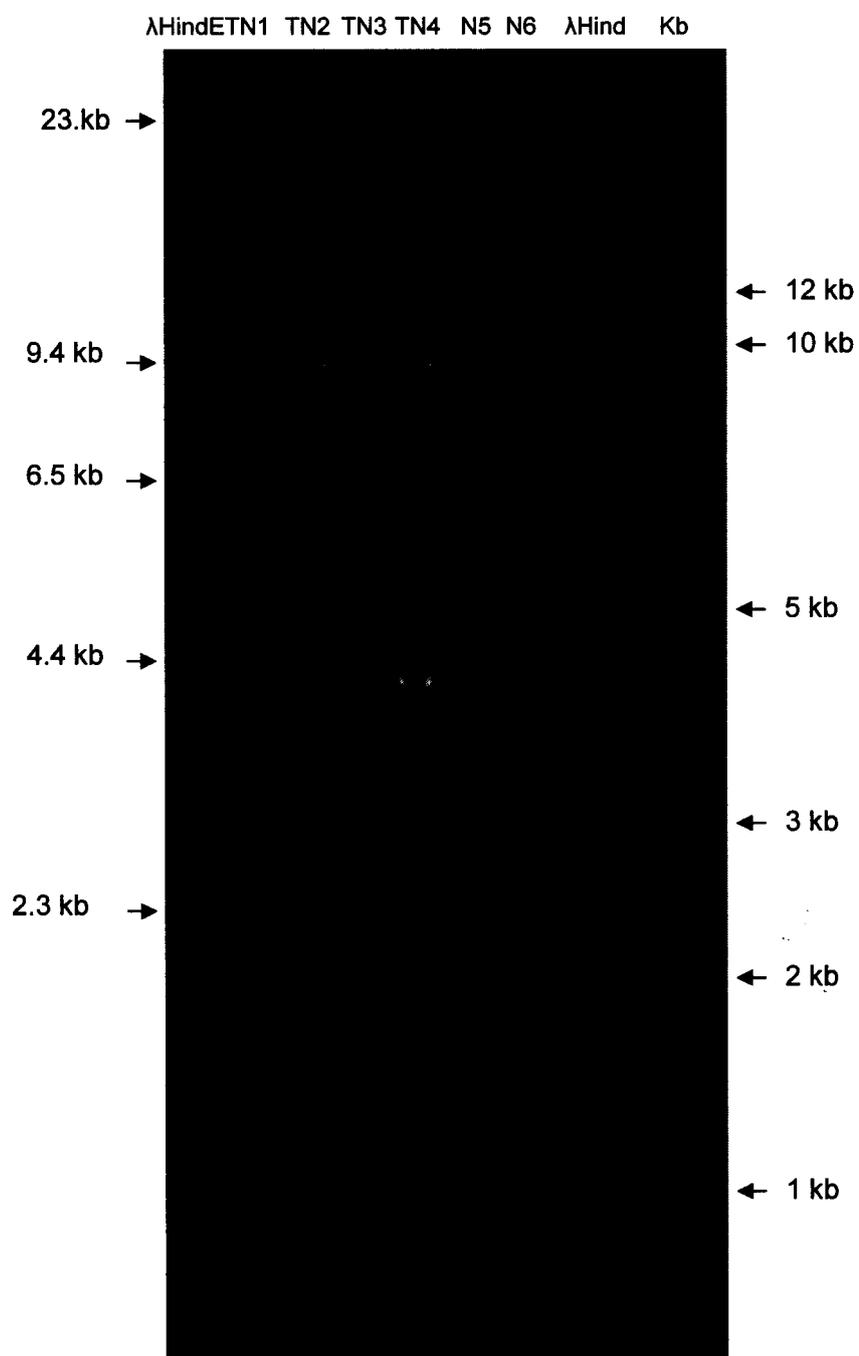


FIGURA 6

ES 2 383 077 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidad Pablo de Olavide	
5	<120> SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE BIBLIOTECAS METAGENÓMICAS	
10	<130> P6242ES01	
	<160> 35	
15	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 28	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
25	<223> Cebador directo <i>OriTHpaIFw</i>	
	<400> 1	
30	caagttaacc ttgccctcat ctggttacg	28
	<210> 2	
35	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Cebador reverso <i>OriTHpaIRev</i>	
	<400> 2	
45	tccggttaacc cagtcggtag atattccac	29
	<210> 3	
50	<211> 95	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
55	<220>	
	<223> Cebador <i>psalnut1</i>	
60	<400> 3	
	taaggcgcct tattgctggt gcccggcgg gcgcaatatt catggtgatg atttattata	60
65	tatcgagtgg tgtatttatc aatattgttt gctcc	95

ES 2 383 077 A1

<210> 4
<211> 74
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador *psalnut2*
10
<400> 4

gtcaccttca tggtaggtcag tgcgtcctgc tgattaataa cgataacgga gcaaacaata 60
15
ttgataaata cacc 74

20
<210> 5
<211> 85
<212> DNA
25 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador *psalnut3*
30
<400> 5

gcactgacca ccatgaaggt gacgctctta aaaattaagc cctgaagaag ggcagcattc 60
35
aaagcagaag gctttgggggt gtgtg 85

40
<210> 6
<211> 68
<212> DNA
45 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador *psalnut4*
50
<400> 6

tatggcgccc cggaatcgca cttacggcca atgcttcggt tcgtatcaca caccccaaag 60
55
ccttctgc 68

60 <210> 7
<211> 18
<212> DNA
65 <213> Artificial Sequence

ES 2 383 077 A1

<220>
<223> Cebador directo HindChlFw

5 <400> 7
caggcatgca agcttgag 18

10 <210> 8
<211> 18
<212> DNA
15 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador reverso BstZredFRv

20 <400> 8
ggtataccgg catacagc 18

25 <210> 9
<211> 71
30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Cebador KpnISDpT77GFP
<400> 9

40 tagagggtac caataat ttt gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg agtaaaggag 60

aagaactttt c 71

45 <210> 10
<211> 29
<212> DNA
50 <213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Cebador GFPMLuIRvsolap
<400> 10

60 ggaactaaa gacgcgtgct gaagtcaag 29

<210> 11
65 <211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 383 077 A1

	<220>		
	<223> Cebador GFP ^{Mlu} I ^{Fws} solap		
5	<400> 11		
	cttgacttca gcacgcgtct tgtagttcc		29
10	<210> 12		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
15	<220>		
	<223> Cebador GFP ^{Xba} I-TFB-PCRsolap		
20	<400> 12		
	aggtcttcta gattatattgt atagttcatc		30
25	<210> 13		
	<211> 70		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
30	<220>		
	<223> Cebador trg ^{Ec} -P12		
35	<400> 13		
	ggttttttgc atcacatcag gttggttccg ttatttgcct gcattctagg gtgtaggctg		60
40			
	gagctgcttc		70
45	<210> 14		
	<211> 70		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
50	<220>		
	<223> Cebador trg ^{Ec} -BSK2		
55	<400> 14		
	cgcgagggttc tgccgacaca gaatgtttgt gcagacggaa tacatccacc ccatgattac		60
60			
	gccaagctcg		70
65	<210> 15		
	<211> 70		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		

ES 2 383 077 A1

<220>

<223> Cebador terSacP2-G1

5 <400> 15

ccgggcgctt tttttttgcg cgaattcgat tatagagctc atatgaatat ttactaactg 60
gaagaggcac 70

10

<210> 16

<211> 70

<212> DNA

15

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Cebador trgEc-BKS

<400> 16

25 ggttttttg c atcacatcag gttggttccg ttatttgctt gcattctagg taaaacgacg 60

gccagtgagc 70

30

<210> 17

<211> 70

<212> DNA

35

<213> Artificial Sequence

<220>

40 <223> Cebador trgEc-P1

<400> 17

45 cgcgagggtt tgccgacaca gaatgtttgt gcagacggaa tacatccacc gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

50

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

55

<213> Artificial Sequence

<220>

60 <223> Cebador Sac-P1

<400> 18

65 tatagagctc tgtaggctgg agctgcttc 29

ES 2 383 077 A1

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador Sac-P2
10
<400> 19

tatagagctc atatgaatat cctccttag 29
15

<210> 20
<211> 29
20 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
25 <223> Cebador NotN

<400> 20

tatgcggccg cccactggcg gtgatactg 29
30

<210> 21
<211> 27
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
40 <223> Cebador KspN

<400> 21

taaccgcgga aagccaaggc caatatc 27
45

<210> 22
50 <211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Cebador thnB-6-thnC

<400> 22
60
gatcatgcat 10

<210> 23
65 <211> 314
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 383 077 A1

<220>

<223> Secuencia *oriT* de RP4

5 <400> 23

cttgcctca tctgttacgc cggcggtagc cggccagcct cgcagagcag gattcccgtt 60

10 gagcaccgcc aggtgcgaat aagggacagt gaagaaggaa caccgcgctcg cgggtgggcc 120

15 tacttcacct atcctgcccg gctgacgocg ttggatacac caaggaaagt ctacacgaac 180

cctttggcaa aatcctgtat atcgtgcgaa aaaggatgga tataccgaaa aaatcgctat 240

20 aatgaccccg aagcagggtt atgcagcgga aaagcgctgc ttccctgctg ttttgtggaa 300

25 tatctaccga ctgg 314

<210> 24

<211> 100

30 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

35 <223> promotor *psal* (incluyendo sitio de reconocimiento del activador *NahR*)

<400> 24

40 ttattgctgg tgcccggccg ggcgcaatat tcatgttgat gatttattat atatcgagtg 60

gtgtatttat caatattggt tgctccgтта tcgттattaa 100

45 <210> 25

<211> 133

<212> DNA

50 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sitio *Nut_L*

55 <400> 25

60 atcagcagga cgcactgacc accatgaagg tgacgctctt aaaaattaag ccctgaagaa 60

gggcagcatt caaagcagaa ggctttgggg tgtgtgatac gaaacgaagc attggccgta 120

65 agtgcgattc cgg 133

ES 2 383 077 A1

<210> 26
 <211> 753
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> *gfp* con la Shine-Dalgarno del gen-10 del fago T7
 10
 <400> 26

 15 aataatTTTg tTTaactTTa agaaggagat atacatatga gTaaaggaga agaactTTTc 60

 actggagTTg tCCcaattct tGttgaatta gatggTgatg tTaatgggca caaattTTTct 120
 20 gtcagTggag agggTgaagg tGatgcaaca tacggaaaac ttaccctTaa atTTattTgc 180

 actactggaa aactacctgt tccatggcca acactTgtca ctactTTcgg tTatggTgTt 240
 25 caatgctTTg cgagataccc agatcatatg aaacagcatg actTTTtcaa gagTgccatg 300

 cccgaaggTt atgtacagga aagaactata tTTTtcaaag atgacgggaa ctacaagacg 360
 30 cgtgctgaag tcaagTTtga aggtgatacc ctTgttaata gaatcgagTt aaaaggTatt 420
 35 gattTTtaaag aagatggaaa cattctTgga cacaattgg aatacaacta taactcacac 480

 aatgtataca tcatggcaga caaacaaaag aatggaatca aagTtaactt caaaattaga 540
 40 cacaacattg aagatggaag cgttcaacta gcagaccatt atcaacaaaa tactccaatt 600
 45 ggcgatggcc ctgtcctTTt accagacaac cattacctgt ccacacaatc tgccctTTcG 660

 aaagatccca acgaaaagag agaccacatg gTccttctTg agTTtgtaac agctgctggg 720
 50 attacacatg gcatggatga actatacaaa taa 753
 55

 <210> 27
 <211> 717
 60 <212> DNA
 <213> *Aequorea victoria*

 65

ES 2 383 077 A1

<400> 27

5 atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60
gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagaggggtg aaggtgatgc aacatacggg 120
10 aaacttacc c ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctggttccatg gccaacactt 180
gtcactactt tcggttatgg tgttcaatgc tttgcgagat acccagatca tatgaaacag 240
15 catgactttt tcaagagtgc catgcccgaag ggttatgtac aggaaagaac tatatttttc 300
20 aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttggt 360
aatagaatcg agttaaaggg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 420
25 ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga 480
30 atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 540
cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggcctgtcc tttaccaga caaccattac 600
35 ctgtccacac aatctgcctt ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt 660
40 cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaataa 717

<210> 28

45 <211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50 <220>

<223> Fragmento con nuevo sitio *Eco72I* flanqueado por dianas *CeuI*

55 <400> 28

cggtaactat aacggtccta aggtagcga tgaatggcac gtggcatcga taactataac 60

60 ggtcctaagg tagcgagc 78

<210> 29

65 <211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 383 077 A1

<220>
<223> *placUV5*

5 <400> 29
ctcactcatt aggcaccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat aatgtgtgga 60

10 attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacag 95

15 <210> 30
<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> *nasF*

25 <400> 30
gagtgaataa aaggttttgg gcagcgcgcc aatggcggcg cgtatgtcca gggataaagg 60

30 cgtccagcgg tgcgtaagca ccgcccggcg cttttttttt gcgc 104

35 <210> 31
<211> 2693
<212> DNA
<213> T7 phage

40

45

50

55

60

65

ES 2 383 077 A1

<400> 31

5	ttactaactg gaagaggcac taaatgaaca cgattaacat cgctaagaac gacttctctg	60
	acatcgaact ggctgctatc ccgttcaaca ctctggctga ccattacggt gagcgtttag	120
10	ctcgcgaaca gttggccctt gagcatgagt cttacgagat ggggtgaagca cgcttccgca	180
	agatgtttga gcgtcaactt aaagctggtg aggttgcgga taacgctgcc gccaaagcctc	240
15	tcatcactac cctactccct aagatgattg cacgcatcaa cgactggttt gaggaagtga	300
	aagctaagcg cggcaagcgc ccgacagcct tccagttcct gcaagaaatc aagccggaag	360
20	ccgtagcgtg catcaccatt aagaccactc tggcttgctt aaccagtgct gacaatacaa	420
	ccgttcaggc tgtagcaagc gcaatcggtc gggccattga ggacgaggct cgcttcggtc	480
30	gtatccgtga ccttgaagct aagcacttca agaaaaacgt tgaggaacaa ctcaacaagc	540
	gcgtagggca cgtctacaag aaagcattta tgcaagttgt cgaggctgac atgctctcta	600
35	agggcttact cggtgggcag gcgtggtctt cgtggcataa ggaagactct attcatgtag	660
	gagtacgctg catcgagatg ctcatgagt caaccggaat ggtagctta caccgcaaaa	720
40	atgctggcgt agtaggtcaa gactctgaga ctatcgaact cgcacctgaa tacgctgagg	780
	ctatcgaac ccgtgcaggt gcgctggctg gcatctctcc gatgttccaa ccttgcgtag	840
50		
55		
60		
65		

ES 2 383 077 A1

	ttcctcctaa gccgtggact ggcattactg gtgggtggcta ttgggctaac ggtcgtcgtc	900
5	ctctggcgct ggtgcgtact cacagtaaga aagcactgat gcgctacgaa gacgtttaca	960
	tgctgaggt gtacaaagcg attaacattg cgcaaaacac cgcatggaaa atcaacaaga	1020
10	aagtcctagc ggtcgccaac gtaatcacca agtggaaagca ttgtccggtc gaggacatcc	1080
	ctgcgattga gcgtgaagaa ctcccgatga aaccggaaga catcgacatg aatcctgagg	1140
	ctctcaccgc gtggaaacgt gctgccgctg ctgtgtaccg caaggacaag gctcgcaagt	1200
20	ctcgccgtat cagccttgag ttcattgcttg agcaagcaa taagtttgct aaccataagg	1260
	ccatctggtt cccttacaac atggactggc gcggtcgtgt ttacgctgtg tcaatgttca	1320
	accgcaagg taacgatatg accaaaggac tgcttacgct ggcgaaaggt aaaccaatcg	1380
30	gtaaggaagg ttactactgg ctgaaaatcc acggtgcaaa ctgtgcgggt gtcgataagg	1440
	ttccggtccc tgagcgcac c aagttcattg aggaaaacca cgagaacatc atggcttgcg	1500
	ctaagtctcc actggagaac acttggtggg ctgagcaaga ttctccgttc tgcttccttg	1560
40	cgttctgctt tgagtacgct ggggtacagc accacggcct gagctataac tgctcccttc	1620
	cgctggcggt tgacgggtct tgctctggca tccagcactt ctccgcgatg ctccgagatg	1680
	aggtaggtgg tcgcgcggtt aacttgcttc ctagtgaac cgttcaggac atctacggga	1740
50	ttgttgctaa gaaagtcaac gagattctac aagcagacgc aatcaatggg accgataacg	1800
	aagtagttac cgtgaccgat gagaacactg gtgaaatctc tgagaaagtc aagctgggca	1860
	ctaaggcact ggctgtcaa tggctggctt acggtgttac tcgcagtgtg actaagcgtt	1920
60	cagtcatgac gctggcttac gggtccaaag agttcggctt ccgtcaacaa gtgctggaag	1980
	ataccattca gccagctatt gattccggca agggctctgat gttcactcag ccgaatcagg	2040

ES 2 383 077 A1

	ctgctggata catggctaag ctgatttggg aatctgtgag cgtgacggtg gtagctgcgg	2100
5	ttgaagcaat gaactggctt aagtctgctg ctaagctgct ggctgctgag gtcaaagata	2160
	agaagactgg agagattctt cgcaagcgtt gcgctgtgca ttgggtaact cctgatggtt	2220
10	tccctgtgtg gcaggaatac aagaagccta ttcagacgcg cttgaacctg atgttcctcg	2280
	gtcagttccg cttacagcct accattaaca ccaacaaaga tagcgagatt gatgcacaca	2340
	aacaggagtc tggatcgcct cctaactttg tacacagcca agacggtagc caccttcgta	2400
20	agactgtagt gtgggcacac gagaagtacg gaatcgaatc tttgcactg attcacgact	2460
	ccttcggtac cattccggct gacgctgcga acctgttcaa agcagtgcgc gaaactatgg	2520
	ttgacacata tgagtcttgt gatgtactgg ctgatttcta cgaccagttc gctgaccagt	2580
30	tgcacgagtc tcaattgyac aaaatgccag cacttcgggc taaaggtaac ttgaacctcc	2640
	gtgacatctt agagtcggac ttcgcgttcg cgtaacgcca aatcaatagc act	2693
	<210> 32	
40	<211> 903	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> <i>nahR</i>	
	<400> 32	
50	tcaatccgta aacagggtcaa acatcagttg ccgcaaccaa atattggcta ggtccttgtg	60
	gtacttcgca tgccagaaca tgttgatggc tatttcaggc aagacgactg ggtgcggcaa	120
	ggcgcttagg ccgaagggct ccacgcagca gtcggctaaa cgtatcggca cagtggcgag	180
60	cagatcggtg cgctggagga tgtggccaac ggcggcgaag tgcggcactt ccagacggat	240
	gtcgcgccgg atgccgacc gtgtcatgta cgtgtccacc tcgccgtggc cggtgccagc	300

ES 2 383 077 A1

	ggcgatgaca cgcacgtggc cgtaggaaca gaagcgctcc agagtcaggg gttcgcgggt	360
5	gactggatgg tccttgcgac ataggcacac gtagtgattc tggagcagcc ggcgctgaaa	420
	gaagccagtt tgcagattgg gaagcaggcc cacggccaag tccacggttc cgttctgcaa	480
10	ggcctgcatc aggctcatcg aactgtcgcg caccgtactg atcacgcaat tgggggcctg	540
	gtgagccagc acatccatca gccgcggcat gaagtagatc tcgccaatgt cggatcatggc	600
15	caggggtgaag gtacgctcgc tggtcagcgg atcgaagctt tcatggtgct gtagggcggt	660
20	gcgcagtgcg tgcattggccg aagtgcaggg ctccggccaga tgcgcggcat aggggtgtggg	720
	ttccattccc tgatgtgtgc gcacgaagag tgggtcctgt agcgaggtgc gcagggcgttt	780
25	cagcgcattg ctacggcag gctgggtcag gcccaggttc tccgcagtga tagagacgcg	840
30	tctgtcgacc agcaactggt tgaacaccac cagcaggttt aaatccaggt cacgcagttc	900
35	cat	903

<210> 33

40 <211> 154

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> *pnah-psal*

<400> 33

	ggggcctcgc ttgggttatt gctggtgccc ggccgggcgc aatattcatg ttgatgattt	60
55	attatatac gagtgggtga tttatcaata ttgtttgctc cgttatcggtt attaacaagt	120
	catcaataaa gccatctgca ggcatgcaag cttc	154

60

<210> 34

<211> 594

<212> DNA

65 <213> Lambda phage

ES 2 383 077 A1

<400> 34

5	ccactggcgg tgatactgag cacatcagca ggacgcactg accacatga aggtgacgct	60
	cttaaaaaatt aagccctgaa gaagggcagc attcaaagca gaaggctttg ggggtgtgtga	120
10	tacgaaacga agcattggcc gtaagtgcga ttccggatta gctgccaatg tgccaatcgc	180
	gggggggtttt cgttcaggac tacaactgcc acacaccacc aaagctaact gacaggagaa	240
15	tccagatgga tgcacaaaaca cgccgccgcg aacgtcgcgc agagaaacag gctcaatgga	300
20	aagcagcaaa tcccctgttg gttggggtaa gcgcaaaacc agttaaccgc cctattctct	360
	cgctgaatcg caaacgaaa tcacgagtag aaagcgcact aaatccgata gaccttacag	420
25	tgctggctga ataccacaaa cagattgaaa gcaacctgca acgtattgag cgcaagaatc	480
30	agcgcacatg gtacagcaag cctggcgaac gcggcataac atgcagtgga cgccagaaaa	540
	ttaagggaaa atcgattcct cttatctagt tacttagata ttggccttgg cttt	594
35		

<210> 35

<211> 20

40 <212> DNA

<213> Lambda phage

<400> 35

45	taatacgact cactataggg	20
----	-----------------------	----

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100907

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/70** (2006.01)
C12N15/72 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2010255561 A1 (STEINMETEZ ERIC) 07.10.2010	1-6
A	WO 03050240 A2 (LILLY CO ELI) 19.06.2003	1-6
A	EHRMANN M. et al. "In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions". Letters in applied microbiology. Abril 2001. Vol. 32, N.º. 4, páginas 230-234. ISSN 0266-8254.	1-6
A	WAGNER SAMUEL et al. "Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 23.09.2008. Vol. 105. N.º. 38, páginas 14371-14376. ISSN1091-6490.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
23.03.2012

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2010255561 A1 (STEINMETEZ ERIC)	07.10.2010
D02	WO 03050240 A2 (LILLY CO ELI)	19.06.2003
D03	EHRMANN M. et al. "In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions". Letters in applied microbiology. Abril 2001. Vol. 32, Nº. 4, páginas 230-234. ISSN 0266-8254.	
D04	WAGNER SAMUEL et al. "Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 23.09.2008. Vol. 105. Nº. 38, páginas 14371-14376. ISSN1091-6490.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga (reivindicación 1) una célula hospedadora que comprende un fragmento de ADN que, a su vez, comprende un promotor lac UV5, una secuencia del atenuador nasF, una secuencia del gen-1 del fago T7 que codifica para la ARN polimerasa de T7 y donde el promotor está operativamente enlazada a esta secuencia. La reivindicación 2 divulga la célula anterior pero adicionalmente incorporando un vector de clonaje

D01 divulga una célula E.coli hospedadora que incluye el gen de la ARN polimerasa T7, la secuencia codificante del gen T7gpl, el promotor lacUV5, y un operador lac (figuras 2A, 2B).

D02 divulga una célula hospedadora que comprende el gen de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5 (reivindicaciones 1-3).

D03 describe la expresión de GFP bajo condiciones extremas en Escherichia coli con el plásmido QBI63, en donde rsGFP es puesto bajo el control del gen de la T7 ARN polimerasa, la cual es controlada por el lacUV5.

D04 muestra la influencia de las mutaciones en el promotor lacUV5 cuando dirige la expresión de la T7 ARN polimerasa y su papel en la sobreexpresión de proteínas de membrana.

Ninguno de los documentos citados divulga los componentes principales del sistema de expresión de la célula hospedadora (lacUV5, nasF, T7 ARN polimerasa). Igualmente los documentos del estado de la técnica tomados solos o en combinación no permiten deducir de manera obvia para el experto en la materia las células reivindicadas, ni el uso de la misma para la expresión de una biblioteca génica, por lo que las reivindicaciones 1-6 cumplirían con los requisitos de novedad y actividad inventiva, tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la Ley 11/1986.