

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 990**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07013020 .8**

96 Fecha de presentación: **06.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1905828**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Método de clasificación óptica**

30 Prioridad:

07.01.1999 GB 9900298

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73 Titular/es:

MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
20 Park Crescent
London W1B 1AL , GB

72 Inventor/es:

GRIFFITHS, ANDREW;
TAWFIK, DAN y
SEPP, ARMIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de clasificación óptica

La presente invención se refiere a métodos para utilizar en la evolución *in vitro* de bancos moleculares. La presente descripción se refiere a métodos para seleccionar ácidos nucleicos que codifican productos génicos, en los que el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado están conectados mediante compartimentación.

La presente invención se refiere a un método para aumentar la concentración de un ácido nucleico y a un método para producir productos génicos a partir de uno o más elementos genéticos.

La evolución necesita que se genere diversidad genética (diversidad en los ácidos nucleicos), seguida de la selección de los ácidos nucleicos que producen características beneficiosas. Debido a que el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado en un organismo están físicamente conectados (los ácidos nucleicos están confinados dentro de las células para las que codifican), múltiples rondas de mutación y selección pueden dar como resultado la progresiva supervivencia de los organismos con aptitud cada vez mayor. Los sistemas para la evolución rápida de ácidos nucleicos o proteínas *in vitro* imitan de forma ventajosa este proceso a nivel molecular, puesto que el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado están conectados y la actividad del producto génico es seleccionable.

Recientes avances en biología molecular han permitido coseleccionar algunas moléculas según sus propiedades junto con los ácidos nucleicos que las codifican. Los ácidos nucleicos seleccionados después pueden clonarse para un posterior análisis o uso, o someterse a más rondas de mutación y selección.

Un aspecto común a estos métodos es el establecimiento de grandes bancos de ácidos nucleicos. Las moléculas que tengan las características deseadas (actividad) pueden aislarse mediante regímenes de selección que seleccionen la actividad deseada del producto génico codificado, tal como una actividad bioquímica o biológica deseada, por ejemplo actividad de unión.

La tecnología de presentación de fagos ha tenido un gran éxito en proporcionar un vehículo que permite la selección de una proteína presentada proporcionando la conexión fundamental entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado (Smith, 1985; Bass *et al.*, 1990; McCafferty *et al.*, 1993; para un análisis, véase Clackson y Wells, 1994). Las partículas de fagos filamentosos actúan como paquetes de presentación genética con proteínas sobre la parte exterior y, en el interior, los elementos genéticos que las codifican. La estrecha conexión entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado es el resultado del ensamblaje del fago dentro de la bacteria. Puesto que las bacterias individuales raramente sufren una infección múltiple, en la mayoría de los casos todos los fagos producidos por una bacteria individual portarán el mismo elemento genético y presentarán la misma proteína.

Sin embargo, la presentación de fagos se basa en la creación de bancos de ácidos nucleicos *in vivo* en bacterias. Por tanto, la limitación práctica del tamaño del banco en la tecnología de la presentación de fagos es del orden de 10^7 a 10^{11} , incluso aprovechando los vectores de fagos λ con replicones de fagos filamentosos escindibles. La técnica se ha aplicado principalmente a la selección de moléculas con actividad de unión. Un pequeño número de proteínas con actividad catalítica también se ha aislado utilizando esta técnica, pero la selección no se realizó directamente para la actividad catalítica deseada, sino para la unión a un análogo del estado de transición (Widersten y Mannervik, 1995) o para la reacción con un inhibidor suicida (Soumilion *et al.*, 1994; Janda *et al.*, 1997). En fechas más recientes, ha habido algunos ejemplos de enzimas seleccionadas utilizando la presentación de fagos mediante la formación del producto (Atwell y Wells, 1999; Demartis *et al.*, 1999; Jestin *et al.*, 1999; Pederson *et al.*, 1998), pero en todos estos casos la selección no fue para el recambio múltiple.

Se han seleccionado ligandos peptídicos específicos para la unión a receptores mediante selección de afinidad utilizando grandes bancos de péptidos conectados al extremo C-terminal del represor de *lac LacI* (Cull *et al.*, 1992). Cuando se expresa en *E. coli*, la proteína represora conecta físicamente el ligando con el plásmido codificante mediante la unión a una secuencia del operador *lac* sobre el plásmido.

También se ha indicado un sistema de presentación de polisomas completamente *in vitro* (Mattheakis *et al.*, 1994; Hanes y Pluckthun, 1997), en el que péptidos nacientes se unen físicamente a través del ribosoma al ARN que los codifica. Como alternativa, también se ha descrito un sistema completamente *in vitro* para conectar el genotipo al fenotipo mediante fusiones de ARN-péptido (Roberts y Szostak, 1997; Nemoto *et al.*, 1997).

Sin embargo, el alcance de los anteriores sistemas se limita a la selección de proteínas y, además, no permite la selección directa de actividades distintas de la unión, por ejemplo la actividad catalítica o reguladora.

La selección y evolución de ARN *in vitro* (Ellington y Szostak, 1990), denominada a veces SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment", evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (Tuerk y Gold, 1990) permite la selección de la actividad de unión y química, pero sólo para ácidos nucleicos. Cuando la selección es para la unión, una agrupación de ácidos nucleicos se incuba con un sustrato inmovilizado. Los no ligantes se retiran por lavado, después los ligantes se liberan, se amplifican, y el proceso completo se repite en etapas iterativas para enriquecer en secuencias que se unen mejor. Este método también

puede adaptarse para permitir el aislamiento de ADN y ARN catalítico (Green y Szostak, 1992; para un análisis, véase Chapman y Szostak, 1994; Joyce, 1994; Gold *et al.*, 1995; Moore, 1995).

Sin embargo, la selección para la actividad "catalítica" o de unión utilizando SELEX sólo es posible porque la misma molécula desempeña el papel dual de portar la información genética y ser el catalizador o la molécula de unión (aptámero). Cuando la selección es para la "autocatálisis", la misma molécula también debe desempeñar el tercer papel de ser un sustrato. Puesto que el elemento genético debe desempeñar el papel de sustrato y catalizador, la selección sólo es posible para acontecimientos de un solo recambio. Debido a que, en este proceso, el propio "catalizador" es modificado, por definición no es un verdadero catalizador. Además, es posible que las proteínas no puedan seleccionarse utilizando el procedimiento SELEX. La gama de catalizadores, sustratos y reacciones que pueden seleccionarse, por tanto, está gravemente limitado.

De los anteriores métodos, aquellos que permiten rondas iterativas de mutación y selección imitan los mecanismos *in vitro* que normalmente se atribuyen al proceso de la evolución: variación iterativa, selección progresiva de una actividad deseada y replicación. Sin embargo, ninguno de estos métodos desarrollados hasta la fecha ha proporcionado moléculas de diversidad y eficacia funcional comparables a las que se encuentran en la naturaleza. Además, no existen sistemas de "evolución" fabricados por seres humanos que puedan hacer evolucionar ácidos nucleicos y proteínas para lograr la gama completa de actividades bioquímicas y biológicas (por ejemplo, actividades de unión, catalíticas y reguladoras), y que puedan combinar varios procesos que conduzcan a un producto o actividad deseados.

Por tanto, es muy necesario un sistema *in vitro* que supere las limitaciones analizadas anteriormente.

En Tawfik y Griffiths (1998), y en la solicitud de patente internacional WO 99/02671, se describe un sistema para la evolución *in vitro* que supera muchas de las limitaciones descritas anteriormente utilizando la compartimentación en microcápsulas para conectar el genotipo y el fenotipo a nivel molecular.

En Tawfik y Griffiths (1998), y en varias realizaciones de la solicitud de patente internacional WO 99/02671, la actividad deseada de un producto génico produce la modificación del elemento genético que lo codifica (y que está presente en la misma microcápsula). El elemento genético modificado entonces puede seleccionarse en una etapa posterior.

El documento WO 93/03151 describe un método para unir de manera preferente dos o más secuencias de ácidos nucleicos procedentes de una célula individual, en el que la compartimentación de las secuencias de ácidos nucleicos ayuda a mantener la naturaleza preferente de la unión.

En la presente se describe un método en el que la modificación del elemento genético provoca un cambio en las propiedades ópticas del propio elemento, y que tiene muchas ventajas frente a los métodos descritos previamente.

Breve descripción de la invención

Según un primer aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para aislar uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad deseada, cuya expresión puede dar como resultado, directa o indirectamente, la modificación de una propiedad óptica de un elemento genético que codifica el producto génico, que comprende las etapas de:

(a) compartimentar elementos genéticos en microcápsulas;

(b) expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos dentro de las microcápsulas;

(c) clasificar los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada según un cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos.

Las microcápsulas según la presente invención compartimentan elementos genéticos y productos génicos, de forma que permanecen físicamente unidos entre sí.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para aumentar la concentración de una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

(a) formar microcápsulas acuosas en una emulsión de agua en aceite, en el que una pluralidad de microcápsulas incluyen una molécula de ácido nucleico, una esfera que es capaz de unirse a la molécula de ácido nucleico, y una disolución acuosa que comprende los componentes necesarios para realizar la amplificación del ácido nucleico;

(b) amplificar la molécula de ácido nucleico en la microcápsula para formar copias del producto amplificado de la molécula de ácido nucleico; y

(c) capturar las copias del producto amplificado en la esfera dentro de las microcápsulas;

aumentando con ello la concentración de la molécula de ácido nucleico.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un producto génico a partir de uno o más elementos genéticos que comprenden ácidos nucleicos, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar esferas y uno o más elementos genéticos que comprenden ácidos nucleicos, en el que dichas esferas están adaptadas para acoplarse a dicho uno o más elementos genéticos y al producto génico producido a partir de dichos elementos genéticos, y dicho uno o más elementos genéticos están adaptados para acoplarse a dichas esferas, y combinar dichas esferas y elementos genéticos de modo que dichos elementos genéticos se unen a dichas esferas;

(b) compartimentar dicho uno o más elementos genéticos unidos a las esferas dentro de las microcápsulas acuosas con los componentes necesarios para producir un producto génico a partir de dicho uno o más elementos genéticos, estando dichas microcápsulas formadas a partir de una emulsión de agua en aceite;

(c) expresar dicho uno o más elementos genéticos dentro de dichas microcápsulas para producir los respectivos productos génicos, de modo que dichos productos génicos se acoplan de nuevo a dichas esferas;

en el que dicha etapa de expresión comprende la transcripción, la traducción inversa, la replicación o la traducción, y dicho producto génico se selecciona de ADN, ARN o una proteína, o un ácido nucleico o una proteína que contiene bases o aminoácidos no naturales.

Tal como se emplea en la presente, un elemento genético es una molécula o una construcción molecular que comprende un ácido nucleico. Los elementos genéticos de la presente invención pueden comprender cualquier ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, o cualquier análogo natural o artificial de éstos). El componente de ácido nucleico del elemento genético también puede estar conectado, de modo covalente o no covalente, con una o más moléculas o estructuras, incluyendo proteínas, entidades y grupos químicos, y soportes en fase sólida, tales como esferas (incluyendo esferas no magnéticas, magnéticas y paramagnéticas), y similares. En el método de la descripción, estas estructuras o moléculas pueden diseñarse para ayudar a la clasificación y/o el aislamiento del elemento genético que codifica un producto génico con la actividad deseada.

La expresión, tal como se emplea en la presente, se utiliza en su sentido más amplio, y significa que un ácido nucleico contenido en el elemento genético se convierte en su producto génico. Por tanto, cuando el ácido nucleico es ADN, la expresión se refiere a la transcripción del ADN en ARN; cuando este ARN codifica una proteína, la expresión también puede referirse a la traducción del ARN a la proteína. Cuando el ácido nucleico es ARN, la expresión puede referirse a la replicación de este ARN en otras copias de ARN, la transcripción inversa del ARN en ADN y, opcionalmente, la transcripción de este ADN en otra molécula o moléculas de ARN, así como opcionalmente la traducción de cualquier especie de ARN producida en la proteína. Preferiblemente, por tanto, la expresión es realizada mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en la transcripción, la transcripción inversa, la replicación, y la traducción.

La expresión del elemento genético, por tanto, puede dirigirse a ADN, ARN o a una proteína, o a un ácido nucleico o proteína que contenga bases o aminoácidos no naturales (el producto génico) dentro de la microcápsula de la invención, de modo que el producto génico está confinado dentro de la misma microcápsula que el elemento genético.

El elemento genético y el producto génico codificado por él se unen confinando dicho elemento genético y el respectivo producto génico codificado por el elemento genético dentro de la misma microcápsula. De esta manera, el producto génico en una microcápsula no puede provocar un cambio en ninguna otra microcápsula. Además, pueden emplearse otros medios de unión para unir productos génicos a los elementos genéticos que los codifican, tal como se indica a continuación.

El término "microcápsula" se emplea en la presente según el significado que normalmente se le asigna en la técnica y que se describe más a fondo a continuación. En esencia, sin embargo, una microcápsula es un compartimento artificial cuyos bordes delimitantes limitan el intercambio de los componentes de los mecanismos moleculares descritos en la presente, lo cual permite la clasificación de los elementos genéticos según la función de los productos génicos que codifican.

Preferiblemente, las microcápsulas utilizadas en el método de la presente invención serán capaces de ser producidas en gran cantidad, y así pueden compartimentar un banco de elementos genéticos que codifican un repertorio de productos génicos.

Tal como se emplea en la presente, un cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos se refiere a cualquier cambio en la absorción o la emisión de radiación electromagnética, incluyendo cambios en la absorbancia, la luminiscencia, la fosforescencia o la fluorescencia. Todas estas propiedades están incluidas en el término "óptico/óptica". Los elementos genéticos pueden clasificarse, por ejemplo, mediante una clasificación activada por luminiscencia, fluorescencia o fosforescencia. En una realización preferida, se emplea la citometría de flujo para clasificar elementos genéticos, por ejemplo, puede utilizarse la dispersión de luz (Kerker, 1983) y la polarización de fluorescencia (Rolland *et al.*, 1985) para activar la clasificación de flujo. En una realización muy preferida, los elementos genéticos se clasifican utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) (Norman,

1980; Mackenzie y Pinder, 1986).

Los cambios en las propiedades ópticas pueden ser directos o indirectos. Por tanto, el cambio puede producir una alteración en una propiedad óptica del propio elemento genético, o puede conducir indirectamente a dicho cambio. Por ejemplo, la modificación de un elemento genético puede alterar su capacidad para unirse a un ligando ópticamente activo, alterando con ello indirectamente sus propiedades ópticas.

Como alternativa, pueden utilizarse técnicas de formación de imágenes para seleccionar películas finas de elementos genéticos para permitir el enriquecimiento en un elemento genético con propiedades deseables, por ejemplo mediante el aislamiento físico de una región en la que está situado un elemento genético con propiedades deseables, o la ablación de elementos genéticos no deseados. Los elementos genéticos pueden detectarse mediante luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente descripción, la clasificación de los elementos genéticos puede realizarse mediante una de dos técnicas fundamentalmente:

(I) En una primera realización, los elementos genéticos se clasifican después de la reunión de las microcápsulas en uno o más compartimentos comunes. En esta realización, un producto génico que tenga la actividad deseada modifica el elemento genético que lo codifica (y que reside en la misma microcápsula) para que sea seleccionable como resultado de sus propiedades ópticas modificadas en una posterior etapa. Las reacciones se detienen y las microcápsulas entonces se rompen de modo que todos los contenidos de las microcápsulas individuales se reúnen. La modificación del elemento genético en la microcápsula puede dar como resultado directamente la modificación de las propiedades ópticas del elemento genético. Como alternativa, la modificación puede permitir que los elementos genéticos después se modifiquen fuera de las microcápsulas, para inducir un cambio en sus propiedades ópticas. La selección de los elementos genéticos con las propiedades ópticas modificadas permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada. Por consiguiente, la descripción proporciona un método según el primer aspecto de la descripción, en el que en la etapa (b), el producto génico que tiene la actividad deseada modifica al elemento genético que lo codifica para permitir el aislamiento del elemento genético como resultado de un cambio en las propiedades ópticas del elemento genético. Por supuesto, debe entenderse que la modificación puede ser directa, en el sentido de que es provocada por la acción directa del producto génico sobre el elemento genético, o indirecta, en la que una serie de reacciones, de las cuales una o más implican al producto génico que tiene la actividad deseada, conduce a la modificación del elemento genético.

(II) En una segunda realización, los elementos genéticos pueden clasificarse mediante un procedimiento de múltiples etapas, que implica al menos dos etapas, por ejemplo, para permitir la exposición de los elementos genéticos a condiciones que permiten que se produzcan al menos dos reacciones distintas. Tal como será evidente para los expertos en la técnica, la primera etapa de microencapsulación de la descripción produce, de forma ventajosa, unas condiciones que permiten la expresión de los elementos genéticos (sea la transcripción, la transcripción y/o la traducción, la replicación, o similares). Bajo estas condiciones, puede no ser posible seleccionar para una actividad del producto génico concreta, por ejemplo, debido a que el producto génico puede no ser activo bajo estas condiciones, o debido a que el sistema de expresión contiene una actividad que interfiere. Por tanto, la descripción proporciona un método según un primer aspecto de la presente descripción, en el que la etapa (b) comprende expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos dentro de las microcápsulas, unir los productos génicos a los elementos genéticos que los codifican, y aislar los complejos así formados. Esto permite aislar los elementos genéticos y sus productos génicos asociados de las cápsulas antes de realizar la clasificación según la actividad del producto génico. En una realización preferida, los complejos se someten a otra etapa de compartimentación antes de aislar los elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene la actividad deseada. Esta otra etapa de compartimentación, que de modo ventajoso se realiza en las microcápsulas, permite la realización de otras reacciones, bajo condiciones diferentes, en un entorno en el que los elementos genéticos y sus respectivos productos génicos están físicamente conectados. La clasificación final de los elementos genéticos puede realizarse según la realización (I) anterior.

La "encapsulación secundaria" también puede realizarse con los elementos genéticos conectados a los productos génicos mediante otros medios, tales como presentación de fagos, presentación de polisomas, fusión de ARN-péptido, o fusión de represor lac-péptido.

El elemento o elementos genéticos seleccionados también pueden someterse a posteriores rondas, opcionalmente más rigurosas, de clasificación en etapas iterativamente repetidas, volviendo a aplicar el método de la descripción en su totalidad o sólo en etapas seleccionadas. Adaptando las condiciones de manera apropiada, pueden aislarse los elementos genéticos que codifican productos génicos que tengan una actividad más optimizada, después de cada ronda de selección.

Además, los elementos genéticos aislados después de una primera ronda de clasificación pueden someterse a mutagénesis antes de repetir la clasificación mediante la repetición iterativa de las etapas del método de la descripción, tal como se ha expuesto anteriormente. Después de cada ronda de mutagénesis, algunos elementos genéticos se habrán modificado de tal manera que se haya potenciado la actividad de los productos génicos.

Además, los elementos genéticos modificados pueden clonarse en un vector de expresión para permitir una mayor caracterización de los elementos genéticos y sus productos.

En un segundo aspecto, la descripción proporciona un producto cuando se selecciona según el primer aspecto de la descripción. Tal como se emplea en este contexto, un "producto" puede referirse a un producto génico que puede seleccionarse según la descripción, o al elemento genético (o la información genética comprendida en él).

En un tercer aspecto, la descripción proporciona un método para preparar un producto génico, cuya expresión puede producir, directa o indirectamente, la modificación de las propiedades ópticas de un elemento genético que lo codifica, que comprende las etapas de:

(a) preparar un elemento genético que codifica el producto génico;

(b) compartimentar los elementos genéticos dentro de microcápsulas;

(c) expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos dentro de las microcápsulas;

(d) clasificar los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada utilizando el cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos; y

(e) expresar el producto génico que tiene la actividad deseada.

Según el tercer aspecto, la etapa (a) comprende preferiblemente preparar un repertorio de elementos genéticos, en el que cada elemento genético codifica un producto génico potencialmente diferente. Los repertorios pueden generarse mediante técnicas convencionales, tales como las empleadas para la generación de bancos previstos para la selección mediante métodos tales como la presentación de fagos. Los productos génicos que tienen la actividad deseada pueden seleccionarse a partir del repertorio, según la presente descripción, según su capacidad para modificar las propiedades ópticas de los elementos genéticos de una manera que se diferencien de las de otros productos génicos. Por ejemplo, los productos génicos deseados pueden modificar las propiedades ópticas en un gran mayor que otros productos génicos, o en un grado menor, incluyendo no modificarlas en absoluto.

En un cuarto aspecto, la descripción proporciona un método para seleccionar un compuesto o compuestos capaces de modular la actividad de un producto génico, cuya expresión puede producir, directa o indirectamente, la modificación de las propiedades ópticas de un elemento genético que lo codifica, que comprende las etapas de:

(a) preparar un repertorio de elementos genéticos que codifican un producto génico;

(b) compartimentar los elementos genéticos dentro de microcápsulas;

(c) expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos dentro de las microcápsulas;

(d) clasificar los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada utilizando el cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos; y

(e) poner en contacto un producto génico que tiene la actividad deseada con el compuesto o compuestos, y controlar la modulación de una actividad del producto génico por el compuesto o compuestos.

De manera ventajosa, el método comprende además la etapa de:

(g) identificar el compuesto o compuestos capaces de modular la actividad del producto génico y sintetizar dicho compuesto o compuestos.

Este sistema de selección puede configurarse para seleccionar moléculas de ARN, ADN o proteínas con actividad catalítica, reguladora o de unión.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La dihidrofolato reductasa puede expresarse a partir de genes traducidos *in vitro* en disolución y de genes unidos a esferas paramagnéticas con idéntica eficacia. La actividad DHFR que resulta de la traducción *in vitro* de los genes *folA* en disolución, o de los genes *folA* unidos a microesferas paramagnéticas se determina mediante el control de la oxidación del NADPH a NADP de modo espectrofotométrico a 340 nm, y la actividad se calcula mediante las velocidades iniciales bajo condiciones $S_0 \gg K_M$ (v_{max}). (♦), traducido a partir de genes en disolución; (■), traducido a partir de genes unidos a microesferas.2.

Figura 2. Microscopía de epifluorescencia de emulsiones de agua en aceite. Demuestra que GFP puede traducirse *in vitro* desde genes unidos a microesferas individuales encapsuladas en los compartimentos acuosos de las emulsiones, y el producto génico traducido se vuelve a unir a las microesferas haciendo que sean fluorescentes.

Figura 3. Análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en microcápsulas y unión *in situ* al elemento genético (microesferas). A: Características de dispersión de luz de las esferas antes de la reacción. El 75% de las

esferas se ensayan como esferas individuales. B: Características de dispersión de luz de las esferas después de la reacción de traducción *in vitro*. Aproximadamente 50% de las esferas entra en la ventana de las esferas individuales. C: La fluorescencia de las microesferas (circunscrita sólo a las esferas individuales) revestidas con el gen GFP-T7 y anticuerpo policlonal anti-GFP es significativamente mayor que la señal procedente de las esferas en que se omitió el gen GFP o el anticuerpo anti-GFP.

Figura 4. Síntesis de biotina-GS-DNP mediante la reacción catalizada por glutatión S-transferasa M2-2 (GST M2-2) humana del 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB; Sigma) con glutatión biotinilado reducido (biotina-GSH).

Figura 5. Detección de esferas paramagnéticas revestidas con el producto de una reacción catalizada por una enzima mediante citometría de flujo. Micropartículas magnéticas revestidas con estreptavidina Sera-Mag™ incubadas con biotina-GS-DNP obtenida mediante la reacción catalizada por GST M2-2 de biotina-GSH y CDBN. La biotina-GS-DNP capturada se detectó mediante la incubación de las micropartículas con un anticuerpo anti-dinitrofenol de ratón, seguido de un fragmento F(ab')₂ de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con FITC. Después de lavar se analizaron 2×10^5 micropartículas mediante citometría de flujo. Todos los reactivos: no se omitieron reactivos de la síntesis enzimática con biotina-GS-DNP; sin GST: la enzima GST M2-2 se omitió de la síntesis; sin biotina-GSH: se omitió la biotina-GSH de la síntesis; sin CDBN: se omitió CDBN de la síntesis.

Figura 6. Síntesis de MeNPO-CO-biotina-β-Ala-GSH (biotina-βala-GSH confinada). Se añadió cloruro de acetilo (5 ml) a metanol anhidro (80 ml). Se dejó que la disolución agitada se enfriase y se añadió d-biotina (4 g). Después de agitar durante la noche, los disolventes se evaporaron al vacío para producir un sólido blanco. El sólido se trituró con éter, se filtró y se secó al vacío (en presencia de pentóxido de fósforo), y se conservó a -20 °C.

Figura 7. Reacción de biotina-βala-GSH confinada con 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y liberación fotoquímica del grupo biotina.

Figura 8. Reacción de biotina-βala-GSH confinada con 4-cloro-3-nitrobenzoato (CNB) y liberación fotoquímica del grupo biotina.

Figura 9. La GST M2-2 humana cataliza la reacción de la biotina-βala-GSH confinada con CDBN y CNB en disolución, y los productos de la reacción puede liberarse mediante irradiación con UV, capturarse sobre esferas y detectarse utilizando anticuerpos antiproducción marcados con fluorescencia y citometría de flujo. Panel A: Características de dispersión de luz de las esferas y ventana para esferas individuales (R1). Panel B: Fluorescencia de las microesferas (limitadas por la ventana R1) procedentes de las reacciones con CDBN. Panel C: Fluorescencia de las microesferas (limitadas por la ventana R1) procedentes de las reacciones con CNB. Las señales de las microesferas procedentes de las reacciones con y sin GST M2-2 se indican como +enz y -enz, respectivamente. Las señales de las microesferas procedentes de reacciones que fueron irradiadas o no con UV se indican como +UV y -UV, respectivamente.

Figura 10. La citometría de flujo puede utilizarse para distinguir las esferas de los compartimentos acuosos de una emulsión que contiene GST M2-2 de las esferas de compartimentos sin GST M2-2 utilizando biotina-βala-GSH confinada y CNB como sustratos. Panel A: Características de dispersión de luz de una mezcla de microesferas marcadas con neutravidina no fluorescentes de 1,0 μm de diámetro (Molecular Probes, F-8777) o esferas de poliestireno revestidas con estreptavidina de 0,93 μm de diámetro (Bangs Laboratories), y se establecieron las ventanas para esferas de Bangs individuales (R1) y esferas de Molecular Probes individuales (R2). Panel B: Fluorescencia de las microesferas tomadas de una mezcla no emulsionada de 98% de esferas de Bangs (sin GST) y 2% de esferas de Molecular Probes (con GST). Panel C: Fluorescencia de microesferas tomadas de una mezcla de dos emulsiones en una proporción del 98% de la emulsión que contiene esferas de Bangs (sin GST) y una emulsión que contiene 2% de esferas de Molecular Probes (con GST). Panel D: Fluorescencia de microesferas tomadas de una mezcla no emulsionada de 98% de esferas de Molecular Probes (sin GST) y 2% de esferas de Bangs (con GST). Panel E: Fluorescencia de microesferas tomadas de una mezcla de dos emulsiones en una proporción del 98% de la emulsión que contiene esferas de Molecular Probes (sin GST) y una emulsión que contiene 2% de esferas de Bangs (con GST). Se superpone la fluorescencia de las esferas no limitadas por ventana (sin ventana), las esferas limitadas por la ventana R1 (R1), y las esferas limitadas por la ventana R2 (R2).

Figura 11. La GST M2-2 humana transcrita y traducida *in vitro* en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite cataliza una reacción que genera un cambio en las propiedades de fluorescencia de microesferas cocompartimentalizadas. Panel A: Características de dispersión de luz de las esferas y ventana para esferas individuales (R1). Panel B: Fluorescencia de las microesferas (limitadas por la ventana R1) procedentes de reacciones no emulsionadas. Panel C: Fluorescencia de las microesferas (limitadas por la ventana R1) procedentes de las reacciones emulsionadas. Las señales de las microesferas procedentes de las reacciones con y sin ADN GSTM2-2.LMB2-3 se indican como +ADN y -ADN, respectivamente. Las señales de las microesferas procedentes de reacciones con y sin GST M2-2 recombinante se indican como +GST y -GST, respectivamente.

Figura 12. Síntesis del sustrato biotinilado confinado EtNP-Bz-Glu-biotina confinada (17).

Figura 13. Hidrólisis del sustrato de PTE, EtNP-Bz-Glu-biotina confinada (17), para producir el producto Et-Bz-Glu-

biotina confinada, y liberación del sustrato y del producto para producir el correspondiente sustrato biotinilado (EtNP-Bz-Glu-biotina) y producto biotinilado (EtNP-Bz-Glu-biotina).

Figura 14. Preparación de conjugados de proteínas de un sustrato de PTE y producto para la inmunización y ELISA.

Figura 15. La PTE cataliza la reacción de EtNP-Bz-Glu-biotina confinada en presencia de esferas revestidas con estreptavidina, y los productos de la reacción se liberan mediante irradiación con UV, se capturan sobre esferas y se detectan utilizando anticuerpos antiproducción marcados con fluorescencia y citometría de flujo. Panel A: Características de dispersión de luz de las esferas y ventana seleccionada para esferas individuales (R2). Panel B: Fluorescencia de las microesferas (limitadas por la ventana R2) procedentes de las reacciones con EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 10 μ M en presencia de fragmentos de ADN OPD.LMB3-2biotina (OPD) o fragmentos de ADN M.HaeIII.LMB3-2biotina (M.HaeIII) traducidos *in vitro*. Panel C: Igual que B pero con EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 20 μ M. Panel D: Igual que B pero con EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 50 μ M.

Figura 16. Reacción de EtNP-Bz-Glu-biotina confinada en presencia de esferas a las que se han unido elementos genéticos que codifican la fosfotriesterasa marcada con el péptido Flag (N-Flag-OPD.LMB3-2biotina) u otra enzima (N-Flag-M.HaeIII.LMB3-2biotina), junto con un anticuerpo que se une al péptido Flag. Las esferas se hacen reaccionar y después se analizan mediante citometría de flujo tal como se describe en el texto. Panel A: Características de dispersión de luz de las esferas y ventana para esferas individuales (R1). Panel B: Fluorescencia de las microesferas (limitadas por la ventana R1) a las que se han unido fragmentos de ADN N-Flag-OPD.LMB3-2biotina (OPD) o fragmentos de ADN M.HaeIII.LMB3-2biotina (M.HaeIII) procedentes de reacciones con EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 12,5 μ M. Panel C: Igual que B pero con EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 25 μ M.

Figura 17. La BirA de *E. coli* transcrita y traducida *in vitro* cataliza una reacción que genera un cambio en las propiedades de fluorescencia de microesferas marcadas con sustrato en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite y en disolución a granel.

Figura 18. Análisis de citometría de flujo de muestras preparadas para el experimento de clasificación.

Figura 19. Clasificación mediante citometría de flujo activada por fluorescencia de los elementos genéticos. Panel A: Las muestras nº 1 a nº 4 antes de la clasificación y después de la clasificación. Panel B: Genes recuperados de esferas individuales clasificadas a partir de la muestra nº 3 clasificadas en una placa de 96 pocillos. Panel C: Genes recuperados de esferas individuales clasificadas a partir de la muestra nº 4 clasificadas en una placa de 96 pocillos. Los marcadores de ADN (M) son una digestión con ϕ X174-HaeIII.

(A) DESCRIPCIÓN GENERAL

Las microcápsulas de la presente descripción requieren poseer una propiedades físicas apropiadas para permitir la realización de la descripción.

En primer lugar, para asegurarse de que los elementos genéticos y los productos génicos no se difundan entre las microcápsulas, los contenidos de cada microcápsula preferiblemente se aíslan de los contenidos de las microcápsulas circundantes, de forma que no exista intercambio o se produzca un pequeño intercambio de elementos genéticos y productos génicos entre las microcápsulas a lo largo de la escala de tiempo del experimento.

En segundo lugar, el método de la presente invención requiere que haya sólo un número limitado de elementos genéticos por microcápsula. Esto asegura que el producto génico de un elemento genético individual se aisle de otros elementos genéticos. Así, el acoplamiento entre el elemento genético y el producto génico será muy específico. El factor de enriquecimiento es mayor con una media de uno o menos elementos genéticos por microcápsula, siendo la conexión entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado lo más estrecha posible, puesto que el producto génico de un elemento genético individual se aislará de los productos de todos los demás elementos genéticos. Sin embargo, aunque no se utilice la situación teóricamente óptima de una media de un solo elemento genético o menos por microcápsulas, una proporción de 5, 10, 50, 100 o 1000 o más elementos genéticos por microcápsula puede demostrar ser beneficiosa para la clasificación de un banco grande. Posteriores rondas de clasificación, incluyendo una nueva encapsulación con una distribución diferente de elementos genéticos, permitirá una clasificación más rigurosa de los elementos genéticos. Preferiblemente, hay un único elemento genético, o menos, por microcápsula.

En tercer lugar, la formación y la composición de las microcápsulas de forma ventajosa no suprime la función de la maquinaria de expresión de los elementos genéticos y la actividad de los productos génicos.

El sistema o sistemas apropiados pueden variar dependiendo de la naturaleza precisa de los requisitos en cada aplicación de la descripción, tal como será evidente para los expertos en la técnica.

Está disponible una amplia variedad de procedimientos de microencapsulación (véase Benita, 1996), y pueden utilizarse para crear las microcápsulas según la presente invención.

En efecto, se han identificado más de 200 métodos de microencapsulación en la bibliografía (Finch, 1993).

Estos incluyen vesículas acuosas envueltas por membranas, tales como vesículas lipídicas (liposomas) (New, 1990) y vesículas de tensioactivos no iónicos (van Hal *et al.*, 1996). Estas son cápsulas de membrana cerrada de una única bicapa o de múltiples bicapas de moléculas ensambladas de modo no covalente, estando separada cada bicapa de su vecina por un compartimento acuoso. En el caso de los liposomas, la membrana está compuesta de moléculas lipídicas; estas son habitualmente fosfolípidos pero también pueden incorporarse esteroides, tales como colesterol, a las membranas (New, 1990). Dentro de los liposomas puede realizarse una diversidad de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas, incluyendo la polimerización de ARN y ADN (Chakrabarti *et al.*, 1994; Oberholzer *et al.*, 1995a; Oberholzer *et al.*, 1995b; Walde *et al.*, 1994; Wick y Luisi, 1996).

Con un sistema de vesículas envueltas por membranas, la mayor parte de la fase acuosa está fuera de las vesículas y, por tanto, no está compartimentalizada. Esta fase acuosa continua se retira, o los sistemas biológicos que contiene se inhiben o se destruyen (por ejemplo, mediante la digestión de los ácidos nucleicos con ADNasa o ARNasa) para que las reacciones se limiten a las microcápsulas (Luisi *et al.*, 1987).

También se ha demostrado que pueden producirse reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas en microcápsulas generadas mediante una diversidad de otros métodos. Muchas enzimas son activas en disoluciones micelares inversas (Bru y Walde, 1991; Bru y Walde, 1993; Creagh *et al.*, 1993; Haber *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1989; Luisi y B., 1987; Mao y Walde, 1991; Mao *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1992; Walde *et al.*, 1994; Walde *et al.*, 1993; Walde *et al.*, 1988), tales como el sistema de AOT-isooctano-agua (Menger y Yamada, 1979).

Las microcápsulas también pueden generarse mediante polimerización interfacial y complejación interfacial (Whateley, 1996). Las microcápsulas de este tipo pueden tener membranas rígidas no permeables, o membranas semipermeables. Las microcápsulas semipermeables limitadas por membranas de nitrato de celulosa, membranas de poliamida y membranas de lípidos-poliamida también pueden sostener reacciones bioquímicas, incluyendo sistemas multienzimáticos (Chang, 1987; Chang, 1992; Lim, 1994). Las microcápsulas de alginato/polilisina (Lim y Sun, 1980), que pueden formarse bajo condiciones muy suaves, también ha demostrado ser muy biocompatibles, proporcionando, por ejemplo, un método eficaz para encapsular células y tejidos vivos (Chang, 1992; Sun *et al.*, 1992).

También pueden utilizarse sistemas de microencapsulación no membranosos basados en el reparto de fases de un entorno acuoso en un sistema coloidal, tal como una emulsión.

Preferiblemente, las microcápsulas de la presente invención se forman a partir de emulsiones, sistemas heterogéneos de dos fases líquidas inmiscibles estando una de las fases dispersa en la otra en forma de gotas de tamaño microscópico o coloidal (Becher, 1957; Sherma, 1968; Lissant, 1974; Lissant, 1984).

Las emulsiones pueden producirse a partir de cualquier combinación adecuada de líquidos inmiscibles. Preferiblemente, la emulsión de la presente invención comprende agua (que contiene los componentes bioquímicos) como la fase presente en forma de gotas finamente divididas (la fase dispersa, interna o discontinua), y un líquido hidrófobo inmiscible (un aceite) como la matriz en la que estas gotas están suspendidas (la fase no dispersa, continua o externa). Estas emulsiones se denominan de "agua en aceite" (W/O, "water-in-oil"). Esto tiene la ventaja de que la fase acuosa completa que contiene los componentes bioquímicos está compartimentalizada en gotas discretas (la fase interna). La fase externa, siendo un aceite hidrófobo, en general no contiene ninguno de los componentes bioquímicos y, por tanto, es inerte.

La emulsión puede estabilizarse mediante la adición de uno o más agentes tensioactivos. Estos tensioactivos se denominan agentes emulgentes y actúan en la interfase de agua/aceite para evitar (o al menos retrasar) la separación de las fases. Muchos aceites y muchos emulgentes pueden utilizarse para la generación de emulsiones de agua en aceite; una reciente compilación lista más de 16.000 tensioactivos, muchos de los cuales se emplean como agente emulgentes (Ash y Ash, 1993). Los aceites adecuados incluyen aceite mineral blanco ligero y tensioactivos no iónicos (Schick, 1966), tales como monooleato de sorbitán (Span™80; ICI) y monooleato de polioxietilensorbitán (Tween™80; ICI).

El uso de tensioactivos aniónicos también puede ser beneficioso. Los tensioactivos adecuados incluyen colato de sodio y taurocolato de sodio. Se prefiere particularmente el desoxicolato de sodio, preferiblemente a una concentración del 0,5% en p/v, o menor. La inclusión de dichos tensioactivos puede, en algunos casos, aumentar la expresión de los elementos genéticos y/o la actividad de los productos génicos. La adición de algunos tensioactivos aniónicos a la mezcla de reacción no emulsionada suprime completamente la traducción. Sin embargo, durante la emulsificación, el tensioactivo se traslada desde la fase acuosa hacia la interfase, y se restablece la actividad. La adición de un tensioactivo aniónico a las mezclas que se van a emulsionar asegura que la reacción se desarrolle sólo después de la compartimentación.

La creación de una emulsión en general requiere la aplicación de energía mecánica para obligar a que las fases se junten. Existe una diversidad de maneras para realizarlo, que utilizan una diversidad de dispositivos mecánicos, incluyendo agitadores (tales como barras de agitación magnética, agitadores con hélices y turbinas, dispositivos con palas y batidoras), homogeneizadores (incluyendo homogeneizadores de rotor-estator, homogeneizadores de

válvulas de alta presión, y homogeneizadores de chorro), molinos de coloides, dispositivos de ultrasonidos y de "emulsificación de membrana" (Becher, 1957; Dickinson, 1994).

Las microcápsulas acuosas formadas en emulsiones de agua en aceite en general son estables con poco o ningún intercambio de elementos genéticos o productos génicos entre las microcápsulas. Además, los inventores han demostrado que varias reacciones bioquímicas se desarrollan en las microcápsulas de emulsión. También son activos procesos bioquímicos complejos, en particular la transcripción y traducción de genes, en las microcápsulas de emulsión. Existe la tecnología para crear emulsiones con volúmenes que abarcan hasta la escala industrial de miles de litros (Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1974; Lissant, 1984).

El tamaño preferido de las microcápsulas variará dependiendo de los requisitos precisos de cualquier proceso de selección individual que se vaya a realizar según la presente invención. En todos los casos, existirá un equilibrio óptimo entre el tamaño del banco de genes, el enriquecimiento requerido y la concentración requerida de componentes en las microcápsulas individuales para lograr una expresión y una reactividad eficaces de los productos génicos.

Los procesos de expresión se producen dentro de cada microcápsula individual proporcionada por la presente invención. Tanto la transcripción como la transcripción-traducción acopladas *in vitro* son menos eficaces a unas concentraciones subnanomolares de ADN. Debido al requisito de que sólo debe estar presente un número limitado de moléculas de ADN en cada microcápsula, esto, por tanto, establece un límite práctico superior al posible tamaño de la microcápsula. Preferiblemente, el volumen medio de las microcápsulas es menor que $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ (que corresponde a un diámetro de una microcápsula esférica menor que $10 \text{ }\mu\text{m}$, más preferiblemente menor que $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ (diámetro de $5 \text{ }\mu\text{m}$), más preferiblemente de aproximadamente $4,2 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ (diámetro de $2 \text{ }\mu\text{m}$), y de manera ideal de aproximadamente $9 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ (diámetro $2,6 \text{ }\mu\text{m}$).

La concentración eficaz de ADN o ARN en las microcápsulas puede aumentarse de modo artificial mediante diversos métodos que son muy conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la adición de productos químicos excluyentes de volumen, tales como polietilenglicoles (PEG) y una diversidad de técnicas de amplificación de genes, incluyendo la transcripción empleando ARN polimerasas que incluyen las procedentes de bacterias tales como *E. coli* (Roberts, 1969; Blattner y Dahlberg, 1972; Roberts *et al.*, 1975; Rosenberg *et al.*, 1975), eucariotas (por ejemplo, Weil *et al.*, 1979; Manley *et al.*, 1983), y bacteriófagos, tales como T7, T3 y SP6 (Melton *et al.*, 1984); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988); amplificación con Qb replicasa (Miele *et al.*, 1983; Cahill *et al.*, 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev *et al.*, 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegren *et al.*, 1988; Barany, 1991); y el sistema de replicación de secuencias autosostenido (Fahy *et al.*, 1991) y la amplificación por desplazamiento de hebra (Walker *et al.*, 1992). Las técnicas de amplificación de genes que requieren la realización de ciclos térmicos, tales como PCR y LCR, pueden utilizarse si las emulsiones y la transcripción o los sistemas de transcripción-traducción acopladas *in vitro* son termoestables (por ejemplo, los sistemas de transcripción-traducción acopladas pueden prepararse a partir de un organismo termoestable, tal como *Thermus aquaticus*).

El aumento de la concentración de ácidos nucleicos local eficaz permite utilizar microcápsulas más grandes de manera eficaz. Esto permite un límite práctico superior preferido para el volumen de la microcápsula de aproximadamente $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ (que corresponde a un diámetro de la esfera de $10 \text{ }\mu\text{m}$).

El tamaño de la microcápsula preferiblemente es lo suficientemente grande para que pueda alojar todos los componentes requeridos de las reacciones bioquímicas que es necesario que se produzcan dentro de la microcápsula. Por ejemplo, *in vitro*, las reacciones de transcripción y las reacciones de transcripción-traducción acopladas requieren una concentración total de nucleósido trifosfato de aproximadamente 2 mM.

Por ejemplo, para transcribir un gen en una única molécula de ARN corta de 500 bases de longitud, esto requerirá un mínimo de 500 moléculas de nucleósido trifosfato por microcápsula ($8,33 \times 10^{-22}$ moles). Para constituir una disolución 2 mM, este número de moléculas se introduce en un volumen de microcápsula de $4,17 \times 10^{-19}$ litros ($4,17 \times 10^{-22} \text{ m}^3$) que si fuera esférica tendría un diámetro de 93 nm.

Además, en particular en el caso de reacciones que implican traducción, debe advertirse que los ribosomas necesarios para que se produzca la traducción tienen, en sí mismos, un diámetro de aproximadamente 20 nm. Por tanto, el límite inferior preferido para las microcápsulas es un diámetro de aproximadamente $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (100 nm).

Por tanto, el volumen de la microcápsula es preferiblemente de un orden entre $5,2 \times 10^{-22} \text{ m}^3$ y $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$, que corresponde con una esfera con un diámetro de entre $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ y $10 \text{ }\mu\text{m}$, más preferiblemente entre aproximadamente $5,2 \times 10^{-19} \text{ m}^3$ y $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ ($1 \text{ }\mu\text{m}$ y $5 \text{ }\mu\text{m}$). Unos diámetros de la esfera de aproximadamente $2,6 \text{ }\mu\text{m}$ son los más ventajosos.

No es una coincidencia que las dimensiones preferidas de los compartimentos (gotas con un diámetro medio de $2,6 \text{ }\mu\text{m}$) sean muy parecidas a las de las bacterias, por ejemplo, *Escherichia* son bacilos de $1,1\text{-}1,5 \times 2,0\text{-}6,0 \text{ }\mu\text{m}$, y *Azotobacter* son células ovoides con un diámetro de $1,5\text{-}2,0 \text{ }\mu\text{m}$. En su forma más simple, la evolución darwiniana se base en el mecanismo de "un genotipo, un fenotipo". La concentración de un único gen, o genoma,

compartimentalizado disminuye de 0,4 nM en un compartimento de 2 μm de diámetro, a 25 pM en un compartimento de 5 μm de diámetro. La maquinaria de transcripción/traducción procariota ha evolucionado para funcionar en compartimentos con un diámetro de aproximadamente 1-2 μm , en los que los genes individuales están a concentraciones aproximadamente nanomolares. Un único gen, en un compartimento de 2,6 μm de diámetro, está a una concentración de 0,2 nM. Esta concentración génica es lo suficientemente alta como para producir una traducción eficaz. La compartimentación en este volumen también asegura que aunque sólo se forme una única molécula del producto génico, esta esté presente a aproximadamente 0,2 nM, lo cual es importante si el producto génico va a tener una actividad modificadora del propio elemento genético. El volumen de la microcápsula, así, se selecciona tomando en cuenta no sólo los requisitos para la transcripción y la traducción del elemento genético, sino también la actividad modificadora requerida del producto génico en el método de la descripción.

El tamaño de las microcápsulas de emulsión puede variarse sencillamente adaptando las condiciones de emulsión utilizadas para formar la emulsión a los requisitos del sistema de selección. Cuanto mayor sea el tamaño de la microcápsula, mayor será el volumen necesario para encapsular un banco de elementos genéticos dado, puesto que el factor limitante en último término será el tamaño de la microcápsula y, por tanto, el número de microcápsulas posibles por unidad de volumen.

El tamaño de las microcápsulas se selecciona no sólo tomando en cuenta los requisitos del sistema de transcripción/traducción, sino también los del sistema de selección empleado para el elemento genético. Por tanto, los componentes del sistema de selección, tales como un sistema de modificación química, pueden requerir unos volúmenes de reacción y/o concentraciones de reactivos que no sean óptimos para la transcripción/traducción. Tal como se ha indicado en la presente, estos requisitos pueden ser considerados en una etapa de reencapsulación secundaria; además, pueden ser considerados mediante la selección del tamaño de la microcápsula para que maximice la transcripción/traducción y la selección como un todo. Se prefiere la determinación empírica del volumen de la microcápsula y la concentración de reactivos óptimos, por ejemplo como se indica en la presente.

Un "elemento genético", según la presente invención, es como se describió anteriormente. Preferiblemente, un elemento genético es una molécula o una construcción seleccionada del grupo que consiste en una molécula de ADN, una molécula de ARN, una molécula de un ácido nucleico parcial o totalmente artificial que consista en bases exclusivamente sintéticas o en una mezcla de bases naturales y sintéticas, estando cualquiera de las anteriores conectada a un polipéptido, y estando cualquiera de las anteriores conectada a cualquier otro grupo molecular o construcción. De manera ventajosa, el otro grupo molecular o construcción puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos nucleicos, sustancias poliméricas, en particular esferas, por ejemplo esferas de poliestireno, y sustancias magnéticas o paramagnéticas, tales como esferas magnéticas o paramagnéticas.

La porción de ácido nucleico del elemento genético puede comprender secuencias reguladoras adecuadas, tales como las requeridas para una expresión eficaz del producto génico, por ejemplo promotores, potenciadores, secuencias de inicio de la traducción, secuencias de poliadenilación, sitios de corte y empalme, y similares.

Tal como será evidente a partir de lo siguiente, en muchos casos el polipéptido u otro grupo molecular o construcción es un ligando o un sustrato que se une directa o indirectamente o reacciona con el producto génico para alterar las propiedades ópticas del elemento genético. Esto permite la clasificación del elemento genético basándose en la actividad del producto génico. El ligando o el sustrato puede conectarse al ácido nucleico a través de una diversidad de medios que serán evidentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, 1996).

Una manera en que la molécula del ácido nucleico pueda conectarse a un ligando o sustrato es a través de la biotilación. Esto puede realizarse mediante una amplificación con PCR con un cebador de 5'-biotilación, de tal forma que la biotina y el ácido nucleico se unan de modo covalente.

El ligando o el sustrato puede unirse al ácido nucleico modificado mediante una diversidad de medios que serán evidentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, 1996). Un ácido nucleico biotilado puede acoplarse a una microesfera de poliestireno o paramagnética (con un diámetro de 0,02 a aproximadamente 5,0 μm) que esté revestida con avidina o estreptavidina y que, por tanto, se unirá al ácido nucleico con una afinidad muy alta. Esta esfera puede derivatizarse con un sustrato o un ligando mediante cualquier método adecuado, tal como añadiendo un sustrato biotilado o mediante acoplamiento covalente.

Como alternativa, un ácido nucleico biotilado puede acoplarse a avidina o estreptavidina complejada con una molécula grande de proteína, tal como tiroglobulina (669 Kd) o ferritina (440 Kd). Este complejo puede derivatizarse con un sustrato o un ligando, por ejemplo mediante acoplamiento covalente con el grupo ϵ -amino de las lisinas, o a través de una interacción no covalente, tal como biotina-avidina.

El sustrato puede estar presente en una forma no conectada al elemento genético pero que contenga un "marcador" inactivo que requiera una etapa posterior para activarlo, tal como una fotoactivación (por ejemplo, de un análogo de biotina "confinada" (Sundberg *et al.*, 1995; Pirrung y Huang, 1996)). El catalizador que se va a seleccionar entonces convierte el sustrato en producto. El "marcador" entonces se activa y el sustrato y/o producto "marcado" es unido por una molécula de unión al marcador (por ejemplo, avidina o estreptavidina) complejada con el ácido nucleico. La

proporción de sustrato a producto unido al ácido nucleico a través del "marcador" reflejará, por tanto, la proporción del sustrato y producto en disolución.

Una alternativa es acoplar el ácido nucleico a un anticuerpo específico del producto (u otra molécula específica del producto). En este escenario, el sustrato (o uno de los sustratos) está presente en cada microcápsula no conectado al elemento genético, pero con un "marcador" molecular (por ejemplo, biotina, DIG o DNP, o un grupo fluorescente). Cuando el catalizador que se va a seleccionar convierte el sustrato en producto, el producto mantiene el "marcador" y después es capturado en la microcápsula por el anticuerpo específico del producto. De esta forma, el elemento genético sólo se asocia con el "marcador" cuando codifica o produce una enzima capaz de convertir el sustrato en producto.

Los términos "aislar", "clasificar" y "seleccionar", así como sus variaciones, se emplean en la presente. El aislamiento, según la presente invención, se refiere al proceso de separar una entidad de una población heterogénea, por ejemplo una mezcla, de forma que esté exenta de al menos una sustancia con la que estaba asociada antes del proceso de aislamiento. En una realización preferida, el aislamiento se refiere a la purificación de una entidad fundamentalmente hasta la homogeneidad. La clasificación de una entidad se refiere al proceso de aislar preferentemente entidades deseadas frente a entidades no deseadas. Cuando esto se relaciona con el aislamiento de entidades deseadas, los términos "aislar" y "clasificar" son equivalentes. El método de la presente descripción permite la clasificación de elementos genéticos deseados a partir de agrupaciones (bancos o repertorios) de elementos genéticos que contienen el elemento genético deseado. La selección se emplea en la presente para indicar el proceso (incluyendo el proceso de clasificación) de aislar una entidad según una propiedad concreta de ésta.

En una aplicación muy preferida, el método de la presente descripción es útil para clasificar bancos de elementos genéticos. Por consiguiente, la descripción proporciona un método según aspectos anteriores de la descripción, en el que los elementos genéticos se aíslan a partir de un banco de elementos genéticos que codifican un repertorio de productos génicos. En la presente, los términos "banco", "repertorio" y "agrupación" se utilizan según su significado normal en la técnica, de forma que un banco de elementos genéticos codifica un repertorio de productos génicos. En general, los bancos se construyen a partir de agrupaciones de elementos genéticos y tienen propiedades que facilitan la clasificación.

La selección inicial de un elemento genético a partir de un banco de elementos genéticos utilizando la presente descripción requerirá, en la mayoría de los casos, la selección de un gran número de elementos genéticos variantes. Los bancos de elementos genéticos pueden crearse en una diversidad de formas diferentes, incluyendo las siguientes.

Las agrupaciones de elementos genéticos naturales pueden clonarse a partir de ADNc o ADN genómico (Sambrook *et al.*, 1989); por ejemplo, los bancos de anticuerpos presentados en fagos, preparados mediante la amplificación por PCR de repertorios de genes de anticuerpos procedentes de donantes inmunizados o no inmunizados, han demostrado ser fuentes muy eficaces de fragmentos de anticuerpos funcionales (Winter *et al.*, 1994; Hoogenboom, 1997). También pueden prepararse bancos de genes codificando todo un gen (véase, por ejemplo, Smith, 1985; Parmley y Smith, 1988) o parte de genes (véase, por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991) o agrupaciones de genes (véase, por ejemplo, Nissim *et al.*, 1994) mediante un oligonucleótido sintético aleatorizado o dopado. También pueden prepararse bancos introduciendo mutaciones en un elemento genético o agrupación de elementos genéticos "de forma aleatoria" mediante una diversidad de técnicas *in vivo*, que incluyen utilizar cepas mutadoras de bacterias, tales como *E. coli* mutD5 (Liao *et al.*, 1986; Yamagishi *et al.*, 1990; Low *et al.*, 1996); y utilizando el sistema de hipermutación de anticuerpos de linfocitos B (Yelamos *et al.*, 1995). También pueden introducirse mutaciones aleatorias *in vivo* e *in vitro* mediante mutágenos químicos, e irradiación ionizante o de UV (véase Friedberg *et al.*, 1995), o la incorporación de análogos de bases mutagénicas (Freese, 1959; Zaccolo *et al.*, 1996). También pueden introducirse mutaciones aleatorias en genes *in vitro* durante la polimerización, por ejemplo, utilizando polimerasas propensas a errores (Leung *et al.*, 1989).

Puede introducirse más diversificación utilizando la recombinación homóloga *in vivo* (véase Kowalczykowski *et al.*, 1994) o *in vitro* (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b).

Por tanto, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de evolución *in vitro* que comprende las etapas de:

- (a) seleccionar uno o más elementos genéticos de un banco de elementos genéticos según la presente invención;
- (b) mutar el elemento o elementos genéticos seleccionados para generar otro banco de elementos genéticos que codifiquen un repertorio de productos génicos; y
- (c) repetir iterativamente las etapas (a) y (b) para obtener un producto génico con actividad potenciada.

Pueden introducirse mutaciones en el elemento o elementos genéticos como se indicó anteriormente.

Los elementos genéticos según la descripción de forma ventajosa codifican enzimas, preferiblemente de interés

farmacológico o industrial, activadores o inhibidores, en especial de sistemas biológicos, tales como mecanismos de transducción de señales celulares, anticuerpos y sus fragmentos, y otros agentes de unión (por ejemplo, factores de transcripción) adecuados para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Por tanto, en un aspecto preferido la descripción permite la identificación y el aislamiento de productos útiles desde el punto de vista clínico o industrial. En otro aspecto de la descripción, se proporciona un producto que se aísla mediante el método de la descripción.

La selección de condiciones de encapsulación adecuadas resulta deseable. Dependiendo de la complejidad y del tamaño del banco que se va a investigar, puede resultar beneficioso disponer el procedimiento de encapsulación de modo que un elemento genético o menos de un elemento genético se encapsule por microcápsula. Esto proporcionará el mayor poder de resolución. Sin embargo, cuando el banco es grande y/o más complejo, esto puede resultar impracticable; puede ser preferible encapsular varios elementos genéticos juntos y confiar en la aplicación repetida del método de la descripción para lograr la clasificación de la actividad deseada. Puede utilizarse una combinación de procedimiento de encapsulación para obtener el enriquecimiento deseado.

Los estudios teóricos sugieren que cuanto mayor sea el número de elementos genéticos variantes creados, más probable será que se cree una molécula con las propiedades deseadas (véase Perelson y Oster, 1979, para una descripción de cómo se aplica esto a repertorios de anticuerpos). En fechas recientes también se ha confirmado a nivel práctico que unos repertorios más grandes de anticuerpos presentados en fagos en efecto producen más anticuerpos con mejor afinidad de unión que unos repertorios más pequeños (Griffiths *et al.*, 1994). Para asegurarse de que se generen variantes raras y, por tanto, que puedan seleccionarse, resulta deseable un tamaño grande del banco. Por tanto, el uso de microcápsulas óptimamente pequeñas es beneficioso.

El repertorio más grande creado hasta la fecha utilizando métodos que requieren una etapa *in vivo* (sistemas de presentación de fagos y LacI) es un banco de péptidos presentados en fagos de $1,6 \times 10^{11}$ clones que requirió la fermentación de 15 litros de bacterias (Fisch *et al.*, 1996). Los experimentos SELEX a menudo se realizan con un número muy alto de variantes (hasta 10^{15}).

Utilizando la presente descripción, con un diámetro de microcápsula preferido de 2,6 μm , puede seleccionarse un tamaño de repertorio de al menos 10^{11} utilizando 1 ml de fase acuosa en una emulsión de 20 ml.

Además de los elementos genéticos descritos anteriormente, las microcápsulas según la descripción comprenderán otros componentes necesarios para que tenga lugar el proceso de clasificación. Otros componentes del sistema comprenderán, por ejemplo, los necesarios para la transcripción y/o la traducción del elemento genético. Estos se seleccionan según los requisitos de un sistema específico a partir de los siguientes: un tampón adecuado, un sistema de transcripción/replicación *in vitro* y/o un sistema de traducción *in vitro* que contenga todos los ingredientes necesarios, enzimas y cofactores, ARN polimerasa, nucleótidos, ácidos nucleicos (naturales o sintéticos), ARN de transferencia, ribosomas y aminoácidos, y los sustratos de la reacción de interés para permitir la selección del producto génico modificado.

Un tampón adecuado será aquel en el que todos los componentes deseados del sistema biológico estén activos y, por tanto, dependerá de los requisitos de cada sistema de reacción específico. Los tampones adecuados para las reacciones biológicas y/o químicas son conocidos en la técnica y se proporcionan recetas en diversos textos de laboratorio, tales como Sambrook *et al.*, 1989.

El sistema de traducción *in vitro* habitualmente comprenderá un extracto celular, generalmente procedente de una bacteria (Zubay, 1973; Zubay, 1980; Lesley *et al.*, 1991; Lesley, 1995), reticulocitos de conejo (Pelham y Jackson, 1976), o germen de trigo (Anderson *et al.*, 1983). Muchos sistemas adecuados están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Promega), incluyendo algunos que permiten la transcripción/traducción acopladas (todos los sistemas bacterianos y los sistemas de extractos de reticulocitos y germen de trigo TNT[™] de Promega). La mezcla de aminoácidos utilizada puede incluir aminoácidos sintéticos si se desea, para aumentar el número o la variedad posibles de proteínas producidas en el banco. Esto puede lograrse cargando ARNt con aminoácidos artificiales y utilizando estos ARNt para la traducción *in vitro* de las proteínas que se van a seleccionar (Ellman *et al.*, 1991; Benner, 1994; Mendel *et al.*, 1995).

Después de cada ronda de selección, el enriquecimiento de la agrupación de elementos genéticos en aquellos que codifican las moléculas de interés puede ensayarse mediante reacciones de transcripción-traducción acopladas o de transcripción/replicación *in vitro* no compartimentalizadas. La agrupación seleccionada se clona en un vector plasmídico adecuado y se produce ARN o proteína recombinante a partir de los clones individuales para la posterior purificación y ensayo.

En un aspecto preferido, el entorno interno de una microcápsula puede alterarse mediante la adición de reactivos a la fase oleosa de la emulsión. Los reactivos se difunden a través de la fase oleosa hacia el entorno acuoso de la microcápsula. Preferiblemente, los reactivos son al menos parcialmente solubles en agua, de forma que una proporción de éstos se distribuye desde la fase oleosa al entorno acuoso de la microcápsula. De forma ventajosa, los reactivos son sustancialmente insolubles en la fase oleosa. Los reactivos preferiblemente se mezclan en la fase oleosa mediante un mezclado mecánico, por ejemplo por agitación en vórtice.

Los reactivos que pueden añadirse a través de la fase oleosa incluyen sustratos, componentes tamponantes,

factores y similares. En particular, el pH interno de las microcápsulas puede alterarse *in situ* añadiendo componentes ácidos o básicos a la fase oleosa.

Además, la descripción se refiere a un método para producir un producto génico, después de que un elemento genético que codifica el producto génico haya sido clasificado mediante el método de la descripción. Evidentemente, el propio elemento genético puede expresarse directamente por medios convencionales para producir el producto génico. Sin embargo, pueden emplearse técnicas alternativas, como será evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la información genética incorporada en el producto génico puede incorporarse en un vector de expresión adecuado, y expresarse a partir de éste.

La descripción también describe el uso de técnicas de selección convencionales para identificar compuestos que sean capaces de interactuar con los productos génicos identificados por el primer aspecto de la descripción. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico que codifica un producto génico se incorpora en un vector y se introduce en células hospedantes adecuadas para producir líneas celulares transformadas que expresen el producto génico. Las líneas celulares resultantes entonces pueden producirse para un análisis cualitativo y/o cuantitativo reproducible del efecto o efectos de fármacos potenciales que afecten a la función del producto génico. Por tanto, las células que expresan el producto génico pueden emplearse para la identificación de compuestos, en particular compuestos de peso molecular pequeño, que modulan la función del producto génico. Por tanto, las células hospedantes que expresan el producto génico son útiles para la selección de fármacos, y otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para identificar compuestos que modulen la actividad del producto génico, comprendiendo dicho método exponer las células que contienen ADN heterólogo que codifica el producto génico, en el que dichas células producen un producto génico funcional, al menos a un compuesto o mezcla de compuestos o señal cuya capacidad para modular la actividad de dicho producto génico se busca determinar, y después controlar dichas células para cambios provocados por dicha modulación. Este ensayo permite la identificación de moduladores, tales como agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos, del producto génico. Tal como se emplea en la presente, un compuesto o señal que modula la actividad del producto génico se refiere a un compuesto que altera la actividad del producto génico de tal forma que la actividad del producto génico es diferente en presencia del compuesto o señal (comparado con la ausencia de dicho compuesto o señal).

Pueden diseñarse ensayos de selección basados en células mediante la construcción de líneas celulares en las que la expresión de una proteína indicadora, es decir, una proteína que puede ensayarse con facilidad, tal como β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP) o luciferasa, depende de un producto génico. Este ensayo permite la detección de compuestos que modulan directamente la función del producto génico, tales como compuestos que antagonizan el producto génico, o compuestos que inhiban o potencien otras funciones celulares requeridas para la actividad del producto génico.

La presente descripción también proporciona un método para afectar a los procesos que se desarrollan en células dependientes de productos génicos de una manera exógena. Células hospedantes que producen productos génicos recombinantes, por ejemplo células de mamífero, pueden ponerse en contacto con un compuesto de ensayo, y entonces puede evaluarse su efecto o efectos moduladores comparando la respuesta mediada por el producto génico en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, o relacionando la respuesta mediada por el producto génico de células de ensayo, o células control (es decir, células que no expresan el producto génico), a la presencia del compuesto.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para optimizar un proceso de producción que implica al menos una etapa que es facilitada por un polipéptido. Por ejemplo, la etapa puede ser una etapa catalítica, que es facilitada por un enzima. Así, la descripción proporciona un método para preparar un compuesto o compuestos, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un protocolo de síntesis en el que al menos una etapa es facilitada por un polipéptido;
- (b) preparar elementos genéticos que codifican variantes del polipéptido que facilita esta etapa, cuya expresión puede producir, directa o indirectamente, la modificación de las propiedades ópticas de los elementos genéticos;
- (c) compartimentar los elementos genéticos dentro de microcápsulas;
- (d) expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos dentro de las microcápsulas;
- (e) clasificar los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada utilizando el cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos; y
- (f) preparar el compuesto o compuestos utilizando el producto génico de polipéptido identificado en (g) para facilitar la etapa pertinente de la síntesis.

Mediante la descripción, las enzimas implicadas en la preparación de un compuesto pueden optimizarse mediante la selección de la actividad óptima. El procedimiento implica la preparación de variantes del polipéptido que se va a investigar, que equivale a un banco de polipéptidos según se indica en la presente. Los variantes pueden prepararse de la misma manera que los bancos analizados en otras partes de la presente.

(B) PROCEDIMIENTOS DE SELECCIÓN

El sistema puede configurarse para que seleccione moléculas de productos génicos de proteínas, ADN o ARN con actividad catalítica, reguladora o de unión.

(i) SELECCIÓN PARA LA UNIÓN

- 5 En el caso de la selección de un producto génico con afinidad por un ligando específico, el elemento genético puede estar conectado al producto génico en la microcápsula a través del ligando. Sólo los productos génicos con afinidad por el ligando se unirán, por tanto, al elemento genético, y sólo los elementos genéticos con el producto génico unido a través del ligando adquirirán las propiedades ópticas cambiadas que les permiten ser retenidos en la etapa de selección. En esta realización, el elemento genético comprenderá, por tanto, un ácido nucleico que codifica el producto génico conectado a un ligando para el producto génico.

El cambio en las propiedades ópticas del elemento genético después de la unión del producto génico al ligando puede inducirse de una diversidad de formas, incluyendo:

- (1) El propio producto génico puede tener propiedades ópticas distintivas, por ejemplo, es fluorescente (por ejemplo, la proteína fluorescente verde (Lorenz *et al.*, 1991)).
- 15 (2) Las propiedades ópticas del producto génico pueden modificarse tras la unión al ligando, por ejemplo, la fluorescencia del producto génico se extingue o se potencia tras la unión (Guixé *et al.*, 1998; Qi y Grabowski, 1998).
- (3) Las propiedades ópticas del ligando pueden modificarse tras la unión del producto génico, por ejemplo, la fluorescencia del ligando se extingue o se potencia tras la unión (Voss, 1993; Masui y Kuramitsu, 1998).
- 20 (4) Las propiedades ópticas del ligando y del producto génico se modifican tras la unión, por ejemplo, pueden haber una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) desde el ligando al producto génico (o viceversa) que da como resultado la emisión, en la longitud de onda de emisión del "aceptor", cuando la excitación se produce en la longitud de onda de absorción del "donante" (Heim y Tsien, 1996; Mahajan *et al.*, 1998; Miyawaki *et al.*, 1997).

- 25 En esta realización, no es necesaria la unión del producto génico al elemento genético a través del ligando para inducir directamente un cambio en las propiedades ópticas. Todos los productos génicos que se van a seleccionar pueden contener un dominio de unión putativo, que se va a seleccionar, y una característica común (un marcador). El elemento genético en cada microcápsula está físicamente conectado con el ligando. Si el producto génico producido a partir del elemento genético tiene afinidad por el ligando, se unirá a él y estará físicamente conectado al mismo elemento genético que lo codifica, lo cual produce que el elemento genético sea "marcado". Al final de la reacción, todas las microcápsulas se reúnen, y todos los elementos genéticos y los productos génicos se agrupan juntos en un entorno. Los elementos genéticos que codifican productos génicos que muestran la unión deseada pueden seleccionarse añadiendo reactivos que se unen de modo específico, o reaccionan de modo específico con el "marcador" y, por tanto, inducen un cambio en las propiedades ópticas del elemento genético, permitiendo su clasificación. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo anti-"marcador" marcado de modo fluorescente, o un anticuerpo anti-"marcador" seguido de un segundo anticuerpo marcado de modo fluorescentes que se une al primero.

- 35 En una realización alternativa, los elementos genéticos pueden clasificarse basándose en que el producto génico, que se une al ligando, simplemente oculta al ligando, por ejemplo, de otros compañeros de unión que de otra forma modificarían las propiedades ópticas del elemento genético. En este caso, se seleccionarían los elementos genéticos con las propiedades ópticas no modificadas.

- 40 En una realización alternativa, la descripción proporciona un método según el primer aspecto de la descripción, en el que en la etapa (b), los productos génicos se unen a los elementos genéticos que los codifican. Los productos génicos, junto con los elementos genéticos unidos, entonces se clasifican como resultado de la unión de un ligando a los productos génicos que tienen la afinidad de unión deseada. Por ejemplo, todos los productos génicos pueden contener una región invariable que se une de modo covalente o no covalente con el elemento genético, y una segunda región que está diversificada para generar la actividad de unión deseada.

- 45 En una realización alternativa, el ligando para el producto génico en sí mismo es codificado por el elemento genético y se une al elemento genético. Dicho de otro modo, el elemento genético codifica dos (o más) productos génicos, y al menos uno de ellos se une al elemento genético, y todos pueden potencialmente unirse entre sí. Sólo cuando los productos génicos interaccionan en una microcápsula se modifica el elemento genético de una manera que, en último término, produce un cambio en sus propiedades ópticas que permite que pueda clasificarse. Esta realización, por ejemplo, se emplea para la búsqueda en bancos de genes de pares de genes que codifican pares de proteínas que se unen entre sí.

- 50 La fluorescencia puede potenciarse mediante el uso de la amplificación de señal de tiramida (TSA™, "Tyramide Signal Amplification") para que los elementos genéticos sean fluorescentes. Esto implica la unión de peroxidasa

(unida a otra proteína) a los elementos genéticos, y la catálisis de la conversión de fluoresceína-tiramina en una forma de radical libre que entonces reacciona (localmente) con los elementos genéticos. Los métodos para realizar la TSA son conocidos en la técnica, y en el mercado están disponibles kits en NEN.

- 5 La TSA puede configurarse de forma que produzca un aumento directo en la fluorescencia del elemento genético, o de forma que un ligando se una al elemento genético que está unido por una segunda molécula fluorescente, o una secuencia de moléculas, siendo una o más fluorescentes.

(ii) SELECCIÓN PARA LA CATÁLISIS

- 10 Cuando la selección se realiza para la catálisis, el elemento genético en cada microcápsula puede comprender el sustrato de la reacción. Si el elemento genético codifica un producto génico capaz de actuar como un catalizador, el producto génico catalizará la conversión del sustrato en el producto. Por tanto, al final de la reacción, el elemento genético está físicamente conectado al producto de la reacción catalizada.

- 15 También puede resultar deseable, en algunos casos, que el sustrato no sea un componente del elemento genético. En este caso, el sustrato contendrá un "marcador" inactivo que requiera una etapa posterior para activarse, tal como una fotoactivación (por ejemplo, de un análogo de biotina "confinado" (Sundberg *et al.*, 1995; Pirrung y Huang, 1996)). El catalizador que se va a seleccionar entonces convierte el sustrato en producto. El "marcador" entonces se activa y el sustrato y/o producto "marcado" es unido por una molécula de unión al marcador (por ejemplo, avidina o estreptavidina) complejada con el ácido nucleico. La proporción de sustrato a producto unido al ácido nucleico a través del "marcador" reflejará, por tanto, la proporción del sustrato y producto en disolución.

- 20 Las propiedades ópticas de los elementos genéticos con el producto unido y que codifican los productos génicos con la actividad catalítica deseada pueden modificarse de las siguientes maneras:

(1) el complejo de producto-elemento genético tiene propiedades ópticas características que no se encuentran en el complejo de sustrato-elemento genético debido a que, por ejemplo:

- 25 (a) el sustrato y el producto tienen diferentes propiedades ópticas (muchos sustratos enzimáticos fluorogénicos están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, Haugland, 1996), incluyendo sustratos para glicosidasas, fosfatasas, peptidasas y proteasas (Craig *et al.*, 1995; Huan *et al.*, 1992; Brynes *et al.*, 1982; Jones *et al.*, 1997; Matayoshi *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990)), o

(b) el sustrato y el producto tienen propiedades ópticas similares, pero sólo el producto, y no el sustrato, se une o reacciona con el elemento genético;

- 30 (2) añadiendo reactivos que se unen de modo específico o reaccionan con el producto y, con ello, inducen un cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos que permiten su clasificación (estos reactivos pueden añadirse antes o después de romper las microcápsulas y reunir los elementos genéticos). Los reactivos:

(a) se unen de modo específico, o reaccionan de modo específico con el producto, y no con el sustrato, si el sustrato y el producto están ambos unidos al elemento genético, o

- 35 (b) opcionalmente se unen al sustrato y al producto sólo si el producto, y no el sustrato, se une o reacciona con el elemento genético.

Los elementos genéticos reunidos que codifican moléculas catalíticas entonces pueden enriquecerse mediante la selección de los elementos genéticos con propiedades ópticas modificadas.

- 40 Una alternativa es acoplar el ácido nucleico a un anticuerpo específico del producto (u otra molécula específica del producto). En este escenario, el sustrato (o uno de los sustratos) está presente en cada microcápsula no conectado al elemento genético, pero con un "marcador" molecular (por ejemplo, biotina, DIG o DNP, o un grupo fluorescente). Cuando el catalizador que se va a seleccionar convierte el sustrato en producto, el producto mantiene el "marcador" y después es capturado en la microcápsula por el anticuerpo específico del producto. De esta forma, el elemento genético sólo se asocia con el "marcador" cuando codifica o produce una enzima capaz de convertir el sustrato en producto. Cuando todas las reacciones se detienen y las microcápsulas se reúnen, los elementos genéticos que codifican enzimas activas estarán "marcados" y pueden tener ya propiedades ópticas cambiadas, por ejemplo, si el "marcador" era un grupo fluorescente. Como alternativa, puede inducirse un cambio en las propiedades ópticas de los genes "marcados" añadiendo un ligando marcado con fluorescencia que se une al "marcador" (por ejemplo, avidina/estreptavidina marcada de modo fluorescente, un anticuerpo anti-"marcador" que es fluorescente, o un anticuerpo anti-"marcador" no fluorescente que puede ser detectado por un segundo anticuerpo marcado de modo fluorescente).
- 50

Como alternativa, la selección puede realizarse de modo indirecto acoplando una primera reacción a posteriores reacciones que tienen lugar en la misma microcápsula. Existen dos formas generales en las que se puede hacer esto. En una primera realización, el producto de la primera reacción se hace reaccionar con una molécula, o es unido por ésta, que no reacciona con el sustrato de la primera reacción. Una segunda reacción acoplada sólo se

desarrollará en presencia del producto de la primera reacción. Entonces puede purificarse un elemento genético que codifica un producto génico con una actividad deseada utilizando las propiedades del producto de la segunda reacción para inducir un cambio en las propiedades ópticas del elemento genético como se ha descrito anteriormente.

- 5 Como alternativa, el producto de la reacción que se está seleccionando puede ser el sustrato o un cofactor para una segunda reacción catalizada enzimáticamente. La enzima que cataliza la segunda reacción puede traducirse *in situ* en la microcápsula, o puede incorporarse en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Sólo cuando la primera reacción se desarrolle, la enzima acoplada generará un producto que puede utilizarse para inducir un cambio en las propiedades ópticas del elemento genético como se ha descrito anteriormente.
- 10 Este concepto de acoplamiento puede desarrollarse para incorporar múltiples enzimas, utilizando cada una como sustrato el producto de la reacción previa. Esto permite la selección de enzimas que no reaccionen con un sustrato inmovilizado. También puede diseñarse para proporcionar una mayor sensibilidad a la amplificación de señales si un producto de una reacción es un catalizador o un cofactor para una segunda reacción o serie de reacciones que conducen a un producto seleccionable (por ejemplo, véase Johannsson y Bates, 1988; Johannsson, 1991). Además,
- 15 un sistema de cascada de enzimas pueden basarse en la producción de un activador para una enzima o la destrucción de un inhibidor de una enzima (véase Mize *et al.*, 1989). El acoplamiento también tiene la ventaja de que puede utilizarse un sistema de selección común para un grupo completo de enzimas que generen el mismo producto, y permite la selección de complejas transformaciones químicas que no se puede realizar en una única etapa.
- 20 Este método de acoplamiento por tanto permite la evolución de nuevas "vías metabólicas" *in vitro* de una manera discontinua, seleccionando y mejorando primero una etapa y luego la siguiente. La estrategia de selección se basa en el producto final de la vía, de forma que todas las etapas previas pueden evolucionar de modo independiente o secuencial sin generar un nuevo sistema de selección para cada etapa de la reacción.
- 25 Expresado de otra manera, se proporciona un método para aislar uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad catalítica deseada, que comprende las etapas de:
 - (1) expresar elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos;
 - (2) permitir que los productos génicos catalicen la conversión de un sustrato en un producto, que puede o no ser directamente seleccionable, según la actividad deseada;
 - (3) opcionalmente acoplar la primera reacción con una o más reacciones posteriores, estando modulada cada
 - 30 reacción por el producto de las reacciones previas, y conduciendo a la creación de un producto seleccionable final;
 - (4) conectar el producto de la catálisis seleccionable con los elementos genéticos mediante:
 - a) el acoplamiento de un sustrato a los elementos genéticos de tal forma que el producto permanece asociado con los elementos genéticos, o
 - b) la reacción o la unión del producto seleccionable con los elementos genéticos a través de un "marcador"
 - 35 molecular adecuado unido al sustrato que permanece sobre el producto, o
 - c) el acoplamiento del producto seleccionable (pero no del sustrato) a los elementos genéticos a través de una reacción específica del producto o una interacción con el producto; y
 - (5) seleccionar el producto de la catálisis, junto con el elemento genético al cual está unido, por medio de sus características propiedades ópticas, o añadiendo reactivos que se unen de modo específico, o reaccionan de modo
 - 40 específico con el producto y que, con ello, inducen un cambio en las propiedades ópticas de los elementos genéticos, en el que en las etapas (1) a (4), cada elemento genético y el respectivo producto génico están contenidos dentro de una microcápsula.

(iii) SELECCIÓN PARA LA ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD DE UN SUSTRATO ENZIMÁTICO

- 45 Los elementos genéticos que codifican enzimas con especificidad o selectividad de sustrato pueden enriquecerse específicamente llevando a cabo una selección positiva para la reacción con un sustrato y una selección negativa para la reacción con otro sustrato. Esta presión de selección positiva y negativa combinada será de gran importancia para aislar enzimas regioselectivas y estereoselectivas (por ejemplo, enzimas que pueden distinguir entre dos enantiómeros del mismo sustrato). Por ejemplo, dos sustratos (por ejemplo, dos enantiómeros diferentes) se marcan
- 50 cada uno con diferentes marcadores (por ejemplo, dos fluoróforos diferentes), de modo que los marcadores se unen al elemento genético mediante la reacción catalizada por la enzima. Si los dos marcadores confieren diferentes propiedades ópticas al elemento genético, puede determinarse la especificidad de sustrato de la enzima a partir de las propiedades ópticas del elemento genético y se rechazan los elementos genéticos que codifiquen productos génicos con la especificidad errónea (o no). También pueden utilizarse marcadores que no confieran ningún cambio en la actividad óptica si se añaden ligandos específicos del marcador con diferentes propiedades ópticas (por

ejemplo, anticuerpos específicos del marcador marcados con diferentes fluoróforos).

(iv) SELECCIÓN PARA LA REGULACIÓN

Puede utilizarse un sistema similar para seleccionar las propiedades reguladoras de las enzimas.

- 5 En el caso de la selección para una molécula reguladora que actúe como activador o inhibidor de un proceso bioquímico, los componentes del proceso bioquímico pueden traducirse *in situ* en cada microcápsula o pueden incorporarse en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Si el elemento genético que se está seleccionando va a codificar un activador, la selección puede realizarse para el producto de la reacción regulada, según se describió anteriormente en conexión con la catálisis. Si se desea un inhibidor, la selección puede ser para una propiedad química específica del sustrato de la reacción regulada.
- 10 Por tanto, se proporciona un método para clasificar uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que muestra una actividad reguladora deseada, que comprende las etapas de:
- (1) expresar elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos;
- (2) permitir que los productos génicos activen o inhiban una reacción bioquímica, o una secuencia de reacciones acopladas, según la actividad deseada, de tal forma que se permite la generación o la supervivencia de una
- 15 molécula seleccionable;
- (3) conectar la molécula seleccionable a los elementos genéticos mediante:
- a) la unión de la molécula seleccionable, o el sustrato del cual deriva, a los elementos genéticos, o
- b) la reacción o la unión del producto seleccionable con los elementos genéticos, a través de un "marcador" molecular adecuado unido al sustrato que permanece sobre el producto, o
- 20 c) el acoplamiento del producto de la catálisis (pero no del sustrato) a los elementos genéticos, a través de una reacción específica del producto o una interacción con el producto;
- (4) seleccionar el producto seleccionable, junto con el elemento genético al cual está unido, por medio de sus características propiedades ópticas, o añadiendo reactivos que se unen de modo específico, o reaccionan de modo específico con el producto y que, con ello, inducen un cambio en las propiedades ópticas de los elementos
- 25 genéticos, en el que en las etapas (1) a (3), cada elemento genético y el respectivo producto génico están contenidos dentro de una microcápsula.

(v) SELECCIÓN PARA LAS PROPIEDADES ÓPTICAS DEL PRODUCTO GÉNICO

- 30 Es posible la selección para las propiedades ópticas inherentes de productos génicos si, en la microcápsula, el producto génico se vuelve a unir al elemento genético, por ejemplo a través de un elemento común del producto génico que se une a un ligando que es parte del elemento genético. Después de reunir los elementos genéticos, estos pueden clasificarse utilizando las propiedades ópticas de los productos génicos unidos. Esta realización puede utilizarse, por ejemplo, para seleccionar variantes de la proteína fluorescente verde (GFP) (Cormack *et al.*, 1996; Delagrave *et al.*, 1995; Ehrig *et al.*, 1995) con mejor fluorescencia y/o nuevos espectros de absorción y emisión.

(vi) CLASIFICACIÓN DE FLUJO DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS

- 35 En una realización preferida de la descripción, los elementos genéticos se clasificarán mediante citometría de flujo. Puede utilizarse una diversidad de propiedades ópticas para activar la clasificación, incluyendo dispersión de luz (Kerker, 1983) y polarización de fluorescencia (Rolland *et al.*, 1985). En una realización muy preferida, la diferencia en las propiedades ópticas de los elementos genéticos será una diferencia en la fluorescencia, y los elementos genéticos se clasificarán utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (Norman, 1980; Mackenzie y
- 40 Pinder, 1986), o un dispositivo similar. En una realización especialmente preferida, el elemento genético comprende una microesfera no fluorescente no magnética (por ejemplo, poliestireno) o paramagnética (véase Fornusek y Vetricka, 1986), de forma óptima con un diámetro de 0,6 a 10 μm , a la cual están unidos el gen y los grupos implicados en la generación de la señal de fluorescencia:
- (1) un equipo de clasificación celular activado por fluorescencia disponible en el mercado procedente de fabricantes establecidos (por ejemplo, Becton-Dickinson, Coulter) permite la clasificación de hasta 10^8 elementos genéticos
- 45 (acontecimientos) por hora;
- (2) la señal de fluorescencia de cada esfera se corresponde estrechamente con el número de moléculas fluorescentes unidas a la esfera. En la actualidad, sólo se pueden detectar cuantitativamente unos pocos cientos de moléculas fluorescentes por partícula;
- 50 (3) el amplio intervalo dinámico de los detectores de fluorescencia (generalmente 4 unidades logarítmicas) permite establecer con facilidad la rigurosidad del procedimiento de clasificación, permitiendo con ello la recuperación del

número óptimo de elementos genéticos a partir de la agrupación inicial (las ventanas pueden establecerse para separar esferas con pequeñas diferencias en la fluorescencia o para separar sólo las esferas con grandes diferencias en la fluorescencia, dependiendo de la selección que se esté realizando);

(4) los equipos de clasificación celular activados por fluorescencia disponibles en el mercado pueden realizar la excitación simultánea de hasta dos longitudes de onda diferentes y detectar la fluorescencia en hasta cuatro longitudes de onda diferentes (Shapiro, 1983), permitiendo realizar selecciones positivas y negativas de modo simultáneo mediante el control del marcaje del elemento genético con dos (o más) marcadores fluorescentes diferentes, por ejemplo, si dos sustratos alternativos para una enzima (por ejemplo, dos enantiómeros diferentes) se marcan con diferentes marcadores fluorescentes, el elemento genético puede marcarse con diferentes fluoróforos dependiendo del sustrato utilizado y sólo se seleccionarán los genes que codifican enzimas con enantioselectividad.

(5) en el mercado están disponibles micropartículas (esferas) no magnéticas y paramagnéticas derivatizadas y no derivatizadas muy uniformes en muchas fuentes (por ejemplo, Sigma, y Molecular Probes) (Fornusek y Vetvicka, 1986).

(vii) PROCEDIMIENTO DE MÚLTIPLES ETAPAS

También se apreciará que, según la presente descripción, no es necesario que todos los procesos de transcripción/replicación y/o traducción, y selección se desarrollen en una sola etapa, con todas las reacciones desarrollándose en una microcápsula. El procedimiento de selección puede comprender dos o más etapas. En primer lugar, la transcripción/replicación y/o la traducción de cada elemento genético de un banco de elementos genéticos puede realizarse en una primera microcápsula. Cada producto génico entonces se conecta al elemento genético que lo codifica (que reside en la misma microcápsula), por ejemplo a través de un ligando específico para el producto génico, tal como un anticuerpo. Las microcápsulas después se rompen, y los elementos genéticos unidos a sus respectivos productos génicos opcionalmente se purifican. Como alternativa, los elementos genéticos pueden unirse a sus respectivos productos génicos utilizando métodos que no se basen en la encapsulación. Por ejemplo, la presentación de fagos (Smith, G.P., 1985), la presentación de polisomas (Mattheakis *et al.*, 1994), la fusión de ARN-péptido (Roberts y Szostak, 1997), o la fusión de péptido-represor lac (Cull *et al.*, 1992).

En la segunda etapa del procedimiento, cada elemento genético purificado unido a su producto génico se introduce en una segunda microcápsula que contiene componentes de la reacción que se va a seleccionar. Entonces se inicia esta reacción. Después de completar las reacciones, las microcápsulas de nuevo se rompen y se seleccionan los elementos genéticos modificados. En el caso de complejas reacciones de múltiples etapas en las que estén implicados muchos componentes individuales y etapas de reacción, pueden realizarse una o más etapas intermedias entre la etapa inicial de creación y conexión del producto génico al elemento genético, y la etapa final de generación del cambio seleccionable en el elemento genético.

Si es necesario, puede lograrse la liberación del producto génico desde el elemento genético dentro de una microcápsula secundaria mediante una diversidad de formas, incluyendo la competición específica con un producto de bajo peso molecular por el sitio de unión, o la ruptura de una región conectora que une el dominio de unión del producto génico, del dominio catalítico de modo enzimático (utilizando proteasas específicas) o autocatalítico (utilizando un dominio de integrina).

(viii) SELECCIÓN POR LA ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UN GEN INDICADOR IN SITU

El sistema puede configurarse de forma que la actividad de unión, catalítica o reguladora deseada codificada por un elemento genético conduzca, directa o indirectamente, a la activación de la expresión de un "gen indicador" que esté presente en todas las microcápsulas. Sólo los productos génicos con la actividad deseada activarán la expresión del gen indicador. La actividad resultante de la expresión del gen indicador permite la selección del elemento genético (o del compartimento que lo contiene) mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente.

Por ejemplo, la activación del gen indicador puede ser el resultado de una actividad de unión del producto génico de una manera análoga al "sistema de dos híbridos" (Fields y Song, 1989). La activación también puede ser el resultado del producto de una reacción catalizada por un producto génico deseable. Por ejemplo, el producto de la reacción puede ser un inductor transcripcional del gen indicador. Por ejemplo, puede utilizarse la arabinosa para inducir la transcripción desde el promotor araBAD. La actividad del producto génico deseable también puede dar como resultado la modificación de un factor de transcripción, produciendo la expresión del gen indicador. Por ejemplo, si el producto génico deseado es una quinasa o una fosfatasa, la fosforilación o la desfosforilación de un factor de transcripción puede conducir a la activación de la expresión del gen indicador.

(ix) AMPLIFICACIÓN

Según otro aspecto de la presente descripción, el método comprende otra etapa de amplificación de los elementos genéticos. Puede utilizarse una amplificación selectiva como medio para el enriquecimiento en elementos genéticos que codifican el producto génico deseado.

En todas las anteriores configuraciones, el material genético comprendido en los elementos genéticos puede

amplificarse y el proceso repetirse en etapas iterativas. La amplificación puede realizarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.*, 1988) o utilizando una de una diversidad de otras técnicas de amplificación génica incluyendo amplificación con Qb replicasa (Cahill, Foster y Mahan, 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev, Kurnasov y Sprin, 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegren *et al.*, 1988; Barany, 1991); el sistema de replicación de secuencias autosostenido (Fahy, Kwoh y Gingeras, 1991) y la amplificación por desplazamiento de hebra (Walker *et al.*, 1992).

Diversos aspectos y realizaciones de la presente invención y la presente descripción se ilustran en los siguientes ejemplos. Se apreciará que pueden modificarse los detalles sin apartarse del alcance de la invención.

Todos los documentos mencionados en el texto se incorporan como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Pueden expresarse enzimas a partir de genes en disolución y de genes unidos a microesferas paramagnéticas con idéntica eficacia.

Un formato para la selección de elementos genéticos mediante la utilización del cambio en sus propiedades ópticas es en el que el elemento genético comprende una microesfera a la cual está unida el gen. A continuación se demuestra cómo un gen para una enzima (dihidrofolato reductasa de *E. coli*) puede unirse a una esfera paramagnética y se traduce *in vitro* de un modo tan eficaz como en disolución.

El gen *folA* de *E. coli* que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) se amplifica mediante PCR utilizando los oligonucleótidos EDHFRFo y EDHFRBa. Este ADN entonces se clona en el vector pGEM-4Z (Promega) digerido con HindIII y KpnI cadena abajo del promotor lac y el promotor de la ARN polimerasa de T7. El oligonucleótido EDHFRBa añade el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 eficaz cadena arriba del codón de inicio de DHFR.

La secuenciación del ADN identifica un clon que tienen la correcta secuencia de nucleótidos. Se ha descubierto que bacterias transformadas con este clon (pGEM-*folA*) sobreexpresan la DHFR activa (dirigido desde el promotor lac) cuando se inducen con IPTG.

El gen *folA* en el plásmido pGEM-*folA* entonces se amplifica mediante PCR utilizando los cebadores *folA*-FW y *folA*-BW, y el fragmento de ADN resultante se digiere con HindIII y XhoI y se subclona en el vector de expresión pET23a digerido con HindIII/XhoI (Novagen) para producir la construcción pET23a/*folA*. La secuencia del gen *folA* amplificado por PCR se verifica mediante secuenciación.

pET23a/*folA* se amplifica aún más con los cebadores 5'-biotinilados pETfor.b y pETrev.b y se marca con radiactividad incluyendo $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP 10 μCi (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) en la mezcla de PCR. El fragmento biotinilado doble de 1765 pb resultante de T7-*folA* se purifica en gel utilizando un kit Qiagen y se cuantifica de modo espectrofotométrico. La actividad específica del producto era de 210000 CPM/pmol de ADN de T7-*folA*, medido en un contador de centelleo Beckman LS6000SC. Se preparan diluciones 10 nM y 1 nM de este ADN en ADN del fago lambda digerido con HindIII 1 mg/ml para eliminar la unión no específica al plástico. Este fragmento de PCR se empleó después para programar un sistema de transcripción/traducción acopladas *in vitro* procariota diseñado para moldes lineales (Lesley, Brow y Burgess, 1991). Se emplea una preparación comercial de este sistema (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (10^3 unidades).

El fragmento de ADN se une a esferas paramagnéticas con estreptavidina (esferas Sera-Mag de 0,74 μm de diámetro, capacidad de unión a biotina 46 nmol/mg, Seradyn, EEUU) parcialmente prerrevestidas con proteína A biotinilada (Sigma). Se añaden 2 μl de proteína A biotinilada 80 μM a 100 μl (1 mg) de esferas, se deja que se desarrolle la unión a temperatura ambiente durante 1 hora, se lava una vez y se reviste durante una hora a temperatura ambiente con IgG de conejo (10 μl de anticuerpo 1 mg/ml por 1 mg de esferas en TBS/Tween 20 al 0,1% (TBST)). Después las esferas se lavan dos veces con TBS/T antes de añadir ADN T7-*folA* biotinilado marcado con radiactividad y se deja que se desarrolle la unión durante 1 hora a temperatura ambiente. La cantidad de ADN T7-*folA* unido se calcula contando la radiactividad unida a una parte alícuota de esferas. Se unió aproximadamente 50% del ADN total.

Se añadieron fragmentos de ADN unidos a esferas o fragmentos de ADN no unidos directamente al sistema S30 Extract System. Las reacciones se incuban durante 2 horas a 37 °C.

Se ensaya la actividad dihidrofolato reductasa mediante un control espectrofotométrico de la oxidación de NADPH a NADP a 340 nm a lo largo de 10 minutos según se describe en Williams *et al.*, 1979, y Ma *et al.*, 1993. Se añaden 2 μl de cada reacción de traducción *in vitro* extinguida a 150 μl de tampón A (imidazol 100 mM, pH 7,0, β -mercaptoetanol 10 mM) y 20 μl de NADPH 1 mM. Se añaden 20 μl de dihidrofolato (1 mM) (H_2F) después de 1 minuto y la reacción se controla a 340 nm utilizando un lector de microplacas ThermoMax (Molecular Devices). La

actividad se calcula mediante las velocidades iniciales bajo condiciones $S_0 \gg K_M$ (v_{max}).

No existe una diferencia significativa en la cantidad de DHFR activa producida si el ADN esta libre o unido a través de biotinas terminales a una esfera revestida de estreptavidina (véase la figura 1).

Ejemplo 2.

- 5 **Una proteína fluorescente (GFP) puede traducirse *in vitro* desde genes unidos a microesferas individuales encapsuladas en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite, y el producto génico traducido se vuelve a unir a las microesferas haciendo que sean fluorescentes.**

10 Un formato para la selección de elementos genéticos es en el que el elemento genético comprende un gen unido a una microesfera, y el producto se vuelve a acoplar a la microesfera dentro de la microcápsula dando como resultado, directa o indirectamente, un cambio en las propiedades ópticas de la microesfera que permite su clasificación.

Se demuestra que una proteína fluorescente (proteína fluorescente verde o GFP) puede transcribirse y traducirse *in vitro* desde genes unidos a microesferas individuales encapsuladas en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite, y el producto génico traducido se vuelve a unir a las microesferas haciendo que sean fluorescentes.

15 La GFP en el plásmido pBS/GFP6 (Siemering *et al.*, 1996) se amplifica mediante PCR utilizando los cebadores GFP-FW y GFP-BW, y el fragmento de ADN resultante se digiere con HindIII y XhoI y se subclona en el vector de expresión pET23a digerido con HindIII/XhoI (Novagen) para producir la construcción pET23a/GFP. La secuencia del gen GFP amplificado por PCR se verifica mediante secuenciación. pET23a/GFP se amplifica aún más con los
20 cebadores 5'-biotinilados pETfor.b y pETrev.b. El fragmento biotinilado doble de 2038 pb resultante de T7-GFP se purifica en gel utilizando un kit Qiagen y se cuantifica de modo espectrofotométrico. Se preparan diluciones 10 nM y 1 nM de este ADN en ADN del fago lambda digerido con HindIII 1 mg/ml para eliminar la unión no específica al plástico. Este fragmento de PCR se empleó después para programar un sistema de transcripción/traducción
25 acopladas *in vitro* procariota diseñado para moldes lineales (Lesley, Brow y Burgess, 1991). Se emplea una preparación comercial de este sistema (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (10^3 unidades).

Como control se empleó un fragmento de ADN T7-foIA biotinilado de 1765 pb (sintetizado mediante PCR como en el ejemplo 1) para programar la síntesis de la proteína DHFR no fluorescente.

30 Se suspendieron 150 μ l de esferas paramagnéticas revestidas con estreptavidina ProActive (Bangs Laboratories, 2×10^7 esferas/ μ l) en Tris 5 mM, pH 7,4/NaCl 1 M/Tween 20 al 0,1% y se dividieron en tres partes alícuotas de 50 μ l. Se añadieron 0,5 μ l de ADN 0,2 μ M (T7-foIA o T7-GFP) a cada parte alícuota de esferas, se incubó a 43 °C durante 15 min, se lavó tres veces en NaH_2PO_4 25 mM, NaCl 125 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,0 (PBS/Tween 20 al 0,1%), se resuspendieron en 40 μ l de TBST y se añadieron 10 μ l de proteína A biotinilada 80 μ M (Sigma) (para producir una
35 concentración final de 15 μ M). Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las esferas se lavaron tres veces en PBS/Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en 15 μ l de premezcla S30 procedente de un sistema *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega), se sonicaron durante un minuto en un baño de sonicación, después se añadió el resto de la
40 mezcla de traducción *in vitro* de S30 (en hielo) y se suplementó con ARN polimerasa de T7 (10^3 unidades).

45 Se añadieron gradualmente 50 μ l de las reacciones de traducción *in vitro* enfriadas en hielo (en 5 partes alícuotas de 10 μ l a lo largo de aproximadamente 2 minutos) a 0,95 ml de la fase oleosa enfriada en hielo (recién preparada disolviendo Span 80 al 4,5% (en v/v) (Fluka) en aceite mineral (Sigma, n° M-5904), seguido de Tween 80 al 0,5% (en v/v) (SigmaUltra, n° P-8074) en un vial Costar Biofreeze de 5 ml (n° 2051)) mientras se agitaba con una barra
50 magnética (8 x 3 mm con un anillo pivotal; Scientific Industries International, Loughborough, Reino Unido). La agitación (a 1150 rpm) continuó durante 3 minutos más en hielo. Después las reacciones se incubaron durante 3 h a 32 °C.

Se extendieron 2 μ l de la emulsión sobre un portaobjetos para microscopio bajo un cubreobjetos redondo de 13 mm y se visualizó utilizando un objetivo 20 x Neofluar en un microscopio Axioplan (Zeiss) equipado con una cámara RTEA CCD-1300-Y CCD (Princeton Instruments). Se emplearon filtros de excitación y de emisión convencionales
55 para la fluoresceína y las imágenes se procesaron con el programa informático IPLab.

Como puede observarse en la figura 2, la GFP traducida a partir de los genes unidos a microesferas individuales encapsuladas en los compartimentos acuosos de las emulsiones se une a las microesferas *in situ* cuando las
microesferas están revestidas con un anticuerpo anti-GFP. Esta unión se observa como concentración de fluorescencia sobre las esferas mediante microscopía de epifluorescencia. No se observó fluorescencia de las
esferas cuando falta el gen GFP o el anticuerpo anti-GFP.

Ejemplo 3.

Una proteína fluorescente (GFP) puede traducirse *in vitro* a partir de genes unidos a microesferas individuales encapsuladas en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite, el producto génico traducido se vuelve a unir a las microesferas y se detecta el aumento en la fluorescencia de las microesferas mediante citometría de flujo.

Se suspendieron 150 μ l de esferas de poliestireno revestidas con estreptavidina (diámetro de 1 μ M; Bangs Laboratories, 2×10^7 esferas/ μ l) en Tris 5 mM, pH 7,4/NaCl 1 M/Tween 20 al 0,1% y se dividieron en tres partes alícuotas de 50 μ l. Se añadieron 0,5 μ l de ADN 0,2 μ M (T7-foIA o T7-GFP) a cada parte alícuota de esferas, se incubó a 43 °C durante 15 min, se lavó tres veces en NaH₂PO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,0 (PBS/Tween 20 al 0,1%), se resuspendieron en 40 μ l de TBST y se añadieron 10 μ l de proteína A biotinilada 80 μ M (Sigma) (para producir una concentración final de 15 μ M). Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las esferas se lavaron tres veces en PBS/Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en 20 μ l de anticuerpo policlonal anti-GFP de conejo a una dilución 1:10 (Clontech) o IgG de conejo no inmunizado 1 mg/ml (Sigma). Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las esferas se lavaron tres veces en PBS/Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en 15 μ l de premezcla S30 procedente de un sistema *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega), se sonicaron durante un minuto en un baño de sonicación, después se añadió el resto de la mezcla de traducción *in vitro* de S30 (en hielo) y se suplementó con ARN polimerasa de T7 (10^3 unidades). Se añadieron gradualmente 50 μ l de las reacciones de traducción *in vitro* enfriadas en hielo (en 5 partes alícuotas de 10 μ l a lo largo de aproximadamente 2 minutos) a 0,95 ml de la fase oleosa enfriada en hielo (recién preparada disolviendo Span 80 al 4,5% (en v/v) (Fluka) en aceite mineral (Sigma, n° M-5904), seguido de Tween 80 al 0,5% (en v/v) (SigmaUltra, n° P-8074) en un vial Costar Biofreeze de 5 ml (n° 2051)) mientras se agitaba con una barra magnética (8 x 3 mm con un anillo pivotal; Scientific Industries International, Loughborough, Reino Unido). La agitación (a 1150 rpm) continuó durante 3 minutos más en hielo. Después las reacciones se incubaron durante 3 h a 32 °C. Para recuperar las mezclas de reacción, las emulsiones se centrifugaron a 3.000 g durante 5 minutos y se retiró la fase oleosa dejando la emulsión concentrada (pero aún intacta) al fondo del vial. Se añadieron PBS y 2 ml de éter saturado con agua, y la mezcla se agitó en vórtice, se centrifugó brevemente y se retiró la fase etérea. Las esferas se lavaron dos veces con PBS y por último se resuspendieron a 10^8 esferas/ml en PBS. Se analizaron 10^4 esferas utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) utilizando una excitación a 488 nm y el filtro de emisión de fluoresceína. La GFP traducida a partir de los genes unidos a microesferas individuales encapsuladas en los compartimentos acuosos de las emulsiones se une a las microesferas *in situ* cuando las microesferas están revestidas con un anticuerpo anti-GFP. La unión de GFP a las microesferas las convierte en fluorescentes (figura 2), y las esferas con GFP unida pueden distinguirse claramente de las que no tienen GFP mediante citometría de flujo (figura 3).

Ejemplo 4.

El producto de una reacción catalizada por una enzima puede capturarse sobre esferas paramagnéticas y las esferas derivatizadas con el producto se identifican mediante citometría de flujo.

Se realizó una reacción catalizada por la enzima glutatión S-transferasa M2-2 humana (GST M2-2) para generar un producto biotinilado (figura 4). Los dos sustratos utilizados fueron 1-cloro-2,4-nitrobenceno (CDNB; Sigma) y glutatión biotinilado reducido (biotina-GSH). El producto generado (biotina-GS-DNP) tiene biotina en un extremo para permitir el acoplamiento a micropartículas paramagnéticas revestidas con estreptavidina y un grupo 2,4-dinitrofenol (DNP) que puede ser unido por un anticuerpo anti-DNP.

La biotina-GSH se sintetizó añadiendo 100 mg de biotinamidocaproato N-hidroxisuccinimida éster (biotina-NHS; Sigma) en 1 ml de DMF a una disolución de glutatión oxidado (Fluka) en 1 ml de agua, 30 μ l de NaOH 12,5 N más 1 ml de DMF. Se añadió la biotina-NHS en hielo, en partes alícuotas de 100 μ l a lo largo de 20 minutos. El pH entonces se ajustó a 7,0 con NaOH 1 N. El precipitado similar a un jarabe que se formó durante la reacción se disolvió mediante un calentamiento hasta la temperatura ambiente, una agitación en vórtice y la adición de 300 μ l de agua. La agitación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente, el pH se volvió a llevar a 7,0 añadiendo NaOH 1 N y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Entonces se empleó NaOH para llevar el pH de nuevo a 7,5, la reacción se agitó durante 30 minutos más a temperatura ambiente y después se incubó durante 30 minutos más añadiendo 500 μ l de DTT 1 M. Los disolventes se evaporaron al vacío y el producto se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C8 y un gradiente de acetonitrilo al 10-40%, TFA al 0,1%. Se sintetizó biotina-GS-DNP enzimáticamente en una reacción de 100 μ l que contenía 1 μ g de GST M2-2 recombinante purificada, CDNB 500 μ M y biotina-GSH 200 μ en KH₂PO₄ 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 6,5. La incubación se realizó durante 1 hora a 25 °C. La reacción fundamentalmente se completó, según se considera siguiendo el aumento en la absorbancia a 340 nm. También se realizaron reacciones control: 1) sin GST, 2) sin CDNB, y 3) sin biotina-GSH. Las reacciones se diluyeron 200 veces (dando una concentración final de biotina 1 μ M) en Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,4 (tampón BW). Se mezclaron 50 μ l de las reacciones diluidas con 50 μ l de tampón BW que contenía 29,3 μ g (10^8 micropartículas) de micropartículas magnéticas revestidas con estreptavidina Sera-Mag™ con diámetro de 0,737 μ m (MG-SA; Seradyn) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las micropartículas se separaron en una placa de microvaloración (Falcon 3911) utilizando un imán (Dynal MPC-96) y se lavaron tres veces

con Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 2,0 M, pH 7,4 (tampón 2x B/W), después dos veces con PBS, Tween 20 al 0,1%. Las micropartículas se resuspendieron en una dilución 1:250 del anticuerpo monoclonal antidinotrofenol de ratón SPE 21-11 (un obsequio del profesor Zelig Eshhar) en PBS/Tween 20 al 0,1% y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las micropartículas se lavaron tres veces en PBS/Tween 20 al 0,1%, se resuspendieron en 1 ml de PBS/Tween 20 al 0,1% que contenía un fragmento F(ab')₂ anti-IgG de ratón de cabra conjugado con FITC (Jackson; 115-096-006) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las micropartículas se lavaron cuatro veces en PBS/Tween 20 al 0,1%, se resuspendieron en 1 ml de PBS/Tween 20 al 0,1%, y se analizaron 2×10^5 micropartículas utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Como puede observarse en la figura 5, no existe diferencia en la distribución de la intensidad de fluorescencia de las esferas en las tres reacciones control (sin GST, sin CDNB, sin biotina-GSH), siendo la fluorescencia media aproximadamente 3. En contraste, las esferas de la reacción catalizada con enzima tienen una fluorescencia media de 34, más de 10 veces mayor. En efecto, utilizando la ventana mostrada (figura 5), 81,1% de las esferas de la reacción catalizada con enzima (y revestidas con el producto biotinilado) están dentro de la ventana, mientras que en las reacciones control no más del 0,06% de las esferas están dentro de la ventana. Por tanto, las esferas revestidas con el producto de la reacción catalizada con GST pueden clasificarse con facilidad de las que no están revestidas.

Ejemplo 5.

La glutatión S-transferasa M2-2 (GST M2-2) empleará como sustrato al glutatión biotinilado confinado y el producto biotinilado confinado generado puede después liberarse mediante irradiación con UV, capturarse sobre esferas revestidas con avidina y detectarse mediante citometría de flujo.

La síntesis de biotina confinada (5) y sus derivados (7) se basa en los protocolos publicados (Pirrung y Huang, 1996; Sundberg *et al.*, 1995). Sin embargo, se realizaron modificaciones significativas de estos protocolos en varias etapas de la síntesis, tal como se describe a continuación.

Biotina metil éster (3, biotina-OMe). Se preparó fundamentalmente según se describe en Sundberg *et al.* (1995) (véase la figura 6).

Metilnitropiperonil alcohol (1, MeNPOH). Se disolvió 3',4'-(metilendioxi)-6'-nitroacetofenona (Lancaster; 6,2 g, 29,6 mmol) en una mezcla de THF (100 ml) y etanol (100 ml). Se añadió borohidruro de sodio (1,12 g, 29,6 mmol) y la disolución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Una TLC (sobre placas revestidas con sílice; disolvente = metanol al 3% en DCM) indicó la conversión completa del material de partida ($R_f = 0,8$) al alcohol ($R_f = 0,6$). Se añadió ácido clorhídrico (1 N) lentamente hasta que se detuvo la emisión de hidrógeno, y los disolventes se evaporaron al vacío. El sólido residual se disolvió en DCM (500 ml) y se lavó con salmuera (40 ml). La fase orgánica se secó (sobre $MgSO_4$) y el disolvente se eliminó al vacío. Una recrystalización en DCM caliente y hexano produjo 6,1 g de **1** (un sólido cristalino amarillo).

O-metilnitropiperonilcarbonilimidazol (2, MeNPO-CO-Im). Se añadió metilnitropiperonil alcohol (1,69 g, 8 mmol) (en varias porciones durante 20 minutos) a una disolución de carbonilimidazol (CDI, 2,6 g, 16 mmol) en DCM (50 ml). La disolución se agitó durante 3 horas, tras lo cual una TLC indicó la conversión completa del alcohol ($R_f = 0,6$ - metanol al 3% en DCM) en el producto ($R_f = 0,45$). Se añadió DCM (100 ml) y agua (30 ml), y la mezcla de reacción se trasladó a un embudo de separación. La mezcla se mezcló y se añadió HCl 1 N (en partes alícuotas de 1 ml) hasta que el pH de la fase acuosa disminuyó por debajo de 6. La fase acuosa se retiró, se añadió más agua (30 ml) y se acidificó hasta pH 6 mientras se mezclaba. Por último, la fase de DCM se lavó con salmuera, se secó (sobre $MgSO_4$) y el disolvente se eliminó al vacío. El sólido remanente se recrystalizó en DCM caliente y hexano para producir 2,2 g de **2** (un sólido cristalino amarillo).

N-(O-metilnitropiperonilcarbonil)biotina metil éster (4, MeNPO-CO-biotina-OMe). Se añadió hidruro de sodio (suspensión al 60% en aceite, 100 mg, 2,5 mmol) a una suspensión agitada de biotina-OMe (517 mg, 2 mmol) y MeNPO-CO-Im (305 mg, 1 mmol) en DCM anhidro (10 ml) en hielo. La disolución se agitó durante 30 minutos en hielo y durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una TLC indicó la completa desaparición de MeNPO-CO-Im ($R_f = 0,6$ - metanol al 55 en DCM) y la aparición del producto ($R_f = 0,45$). También se observaron trazas del alcohol **1** ($R_f = 0,7$) y de un producto secundario con $R_f = 0,95$ (probablemente di-MeNPO-carbonato) (la proporción del producto al anterior producto secundario varía de una preparación a otra; un secado cuidadoso de los materiales de partida y la realización de la reacción en hielo produce en general rendimientos mayores del producto).

Cuando la reacción se completó, se añadió DCM (100 ml) y la disolución se extrajo tres veces con NaH_2PO_4 1 M. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$) y el disolvente se eliminó al vacío. El jarabe remanente se disolvió en DCM caliente (aproximadamente 5 ml), se añadió hexano (aproximadamente 5 ml) hasta el punto de turbidez, y la disolución se dejó en reposo a 4 °C durante la noche. Esto produjo la precipitación del exceso de biotina-OMe como un sólido blanco cristalino (que se lavó con éter, se secó y se utilizó en posteriores reacciones). El filtrado se concentró al vacío y se purificó mediante una cromatografía sobre sílice (metanol del 1,5% al 3% en DCM) para producir **4** como una espuma amarilla (con rendimientos de hasta 385 mg, u 80% basado en equivalentes molares de **2** como material de partida).

N-(O-metilnitropiperonilcarbonil)biotina (5, MeNPO-CO-biotina-OH). Se disolvió MeNPO-CO-biotina-OMe (940 mg, 1,73 mmol) en 25 ml de HCl 0,5 M y dioxano (4:6, vaporizado con argón). La disolución se agitó a 44 °C durante 24 horas bajo una atmósfera de argón. Los disolventes se redujeron al vacío hasta aproximadamente 1 ml, se añadió agua (10 ml) y la mezcla resultante se liofilizó. El sólido resultante se disolvió en DCM con metanol al 2% (20 ml) y se añadió carbón. La mezcla se hirvió durante unos pocos minutos y se filtró. Una TLC (metanol al 10% en DCM) indicó la aparición del producto de la hidrólisis ($R_f = 0,2$) y aproximadamente 5% del material de partida (MeNPO-CO-biotina-OMe, $R_f = 0,9$). Los disolventes se eliminaron al vacío para producir un sólido amarillo que se secó al vacío (860 mg de aproximadamente 95% de **5** más 5% de **4**). Unas concentraciones más altas de HCl (por ejemplo, 1 N) y unas temperaturas mayores (por ejemplo, a reflujo con THF como codisolvente) produjeron la hidrólisis completa del metil éster. Sin embargo, también se observó una cantidad significativa de alcohol **1** y biotina, indicando la hidrólisis del carbamato bajo estas condiciones. También debe advertirse que se descubrió que el metil éster **4** y, en particular, el producto de su hidrólisis (**5**) es sensible a la oxidación. El calentamiento o incluso el almacenamiento de disoluciones de **5** en presencia de aire produce la aparición de oscurecimiento. De manera similar, los intentos de purificar **5** (o sus derivados, por ejemplo **7**) mediante una cromatografía en sílice condujeron a pérdidas muy elevadas debido a la oxidación.

Terc-butil éster del ácido N-(N-(O-metilnitropiperonilcarbonil)biotina)-3-aminopropiónico (6, MeNPO-CO-biotina-β-Ala-OBu^t). Se disolvió MeNPO-CO-biotina-OH (860 mg que contiene aproximadamente 5% de MeNPO-CO-biotina-OMe, aproximadamente 1,6 mmol) en 20 ml de DCM anhidro. Se añadió la sal clorhidrato del terc-butil éster de β-alanina (H-β-Ala-OBu^t) (Bachem; 362 mg, 2 mmol), N-hidroxisuccinimida (172 mg, 1,5 mmol) y trietilamina (280 μl, 2 mmol). La disolución agitada se enfrió en hielo y se añadió EDCI (420 mg, 2,2 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 4 °C y durante 2 horas a temperatura ambiente. Una TLC (metanol al 5% en DCM) indicó la aparición del producto ($R_f = 0,3$) y el resto de MeNPO-CO-biotina-OMe sin reaccionar ($R_f = 0,45$). La reacción se diluyó con DCM (30 ml) y se extrajo tres veces con NaH₂PO₄ 1 M y una vez con NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y el disolvente se eliminó al vacío. El jarabe remanente se purificó mediante una cromatografía en sílice (metanol al 3,0-4,5% en DCM) para producir 640 mg de **6** (una espuma amarilla).

Ácido N-(N-(O-metilnitropiperonilcarbonil)biotina)-3-aminopropiónico (7, MeNPO-CO-biotina-β-Ala-OH). El terc-butil éster **6** (510 mg, 0,84 mmol) se disolvió en 15 ml de HCl 0,5 N y dioxano (4:6, vaporizado con argón). La disolución se agitó a 52 °C durante 24 horas bajo una atmósfera de argón. Se añadió agua (10 ml) y la disolución resultante se liofilizó para producir un sólido que contenía (según se juzgó mediante TLC) el producto de la hidrólisis (**7**) y material de partida (**6**, aproximadamente 10%). Esta mezcla se purificó mediante una cromatografía en columna sobre sílice (metanol al 10% en acetona más ácido acético al 0,1%) para producir 60 mg de **7** (los bajos rendimientos son el resultado principalmente de la oxidación de **7** sobre el sílice).

N-(N-(N-(O-metilnitropiperonilcarbonil)biotina)-3-aminopropionil)glutatión (8, MeNPO-CO-biotina-β-Ala-GSH). Se añadió carbonildiimidazol (20 mg, 120 μmol) a una disolución de MeNPO-CO-biotina-β-Ala-OH (**7**, 49 mg, 89 μmol) en DMF (1,5 ml). La disolución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añadió, en varias partes alícuotas, a una disolución de glutatión oxidado (62 mg, 100 μmol) y trietilamina (55 μl, 0,4 mmol) en DMF (2 ml) más agua (0,15 ml) agitado en hielo. La disolución se agitó en hielo durante 30 minutos y después a temperatura ambiente. Se añadió trietilamina hasta que la disolución se hizo transparente (25 μl), y la reacción entonces se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente. Entonces se añadió DTT (0,25 ml de una disolución 1 M, 0,25 mmol), y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El producto de la anterior reacción se purificó mediante una HPLC en fase inversa, sobre una columna preparativa RP-8, utilizando un gradiente de agua-acetonitrilo en presencia de ácido trifluoroacético al 0,1%. El pico que corresponde a **8** (tiempo de retención = 28,6 minutos) se recogió. El producto entonces se aisló mediante liofilización y se purificó de nuevo sobre una HPLC en fase inversa (utilizando la misma columna y sistema disolvente). El análisis del producto después de la segunda purificación mediante HPLC, utilizando una HPLC en fase inversa analítica, indicó un producto (>95%) cuyo espectro de UV corresponde a **8** (de modo específico, λ_{max} a 355 nm indica la presencia del grupo O-metilnitropiperonilcarbonilo de la biotina confinada). La concentración de **8** se determinó titulando los grupos tiol libres (utilizando DTNB, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), según Hermanson, 1996) derivados del glutatión, y también mediante la absorbancia a 355 nm (que corresponde a la biotina confinada). Ambas medidas independientes producen el mismo resultado dentro del error experimental.

Se descubrió que el **8** purificado también era un sustrato para la GST M2-2 humana en la sustitución electrófila de CDNB (controlada mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm; Habig y Jakoby, 1981) con unas velocidades que son aproximadamente 10 veces más lentas que las observadas con el glutatión bajo condiciones similares.

El MeNPO-CO-biotina-β-Ala-GSH reducido (biotina-β-Ala-GSH confinada) se hizo reaccionar con 1-cloro-2,4-dinitrobenzato (CDNB; Sigma) o con 4-cloro-3-nitrobenzoato (CNB; Acros). El producto confinado generado no se une a la avidina ni a la estreptavidina. Sin embargo, después de la liberación fotoquímica mediante radiación ultravioleta, el producto tiene una biotina en un extremo que se unirá a micropartículas revestidas con avidina o estreptavidina, y un grupo 2,4-dinitrofenol (DNP) o 3-nitrobenzoato que puede ser unido por los anticuerpos anti-DNP o anti-3-nitrobenzoato apropiados (véanse las figuras 7 y 8).

Se centrifugaron 5 μl (10⁸ esferas) de microesferas marcadas con neutravidina no fluorescentes de 1,0 μm de

diámetro (Molecular Probes, F-8777) en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min y se retiró el sobrenadante. Las esferas se resuspendieron en 5 μ l de KH_2PO_4 0,1 M, pH 6,5, EDTA 1 mM, ditiotreitól 2 mM, biotina- β ala-GSH confinada 10 μ M, y CDNB 500 μ M o CNB 500 μ M. Las mezclas de reacción de 5 μ l contienen 0,75 μ g de GST M2-2 humana recombinante purificada o no contienen enzima.

Las reacciones se incubaron durante 30 min (reacciones de CDNB) o durante 4 horas (reacciones de CNB) a 25 °C, tras lo cual se detuvieron mediante la adición de 35 μ l de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0, y se trasladaron a hielo. Cada reacción entonces se dividió en dos partes alícuotas de 20 μ l cada una, una de las cuales se colocó como una gota sobre una capa de parapelícula sobre la superficie de un bloque de aluminio enfriado en hielo. Esta gota entonces se irradió durante 2 min con una bombilla de UV B 100 AP (UVP) mantenida a una distancia de aproximadamente 6 cm. La otra parte alícuota no se irradió. Todas las muestras entonces se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% en un filtro de placas MultiScreen-HV de 0,45 μ m (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado.

Las esferas después se resuspendieron en 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% que contenía anticuerpo anti-DNP de conejo marcado con Alexa-488 20 ng/ μ l (Dako, n° V0401), y antisuero anti-CNB marcado con Alexa-488 20 ng/ μ l, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El antisuero anti-CNB se produjo en conejos mediante una inmunización con conjugados de CNB- CH_2 -KLH preparados añadiendo partes alícuotas de una disolución 200 mM de ácido 4-(bromometil)-3-nitrobenzoico (CNB- CH_2Br) en DMF a disoluciones 5 mg/ml de albúmina de suero bovina (BSA) o hemocianina de lapa (KLH) en tampón borato 50 mM, pH 8,8 (para producir de 1,5 a 6 μ mol de CNB- CH_2Br por mg de proteína). Las mezclas de reacción se agitaron durante 6 horas a temperatura ambiente, y los conjugados de proteínas resultantes se dializaron a fondo contra disolución salina de tampón fosfato (PBS) a 4 °C. El nivel de conjugación (densidad de hapteno o Hd) se determinó midiendo las densidades ópticas de los conjugados a 355 nm. Se descubrió que era de 7 a 11 de grupos CNB- CH_2 por molécula de BSA, y de 9,4 a 24,3 por molécula de KLH dependiendo de la cantidad de CNB- CH_2Br añadida a las muestras de proteínas. El conjugado de CNB- CH_2 -KLH con una Hd de 14,2 se utilizó para inmunizar conejos utilizando protocolos publicados (Tawfik *et al.*, 1993; Tawfik *et al.*, 1997) (obsequio del profesor Z. Eshhar, Weizmann Institute of Science, Rehovot). Los sueros se ensayaron mediante ELISA para la unión al conjugado de CNB- CH_2 -BSA (Hd = 11) y a BSA. El primer sangrado de los conejos inmunizados (cuando la dilución es en 50 veces o mayor) mostró la selectividad deseada, produciendo una señal alta cuando se incubaba con el conjugado de CNB- CH_2 -BSA y muy poco efecto de fondo (<5%) con BSA. El suero anti-CNB se purificó utilizando una columna de proteína A HiTrap (Pharmacia). Ambos anticuerpos anti-CDNB y anti-CNB se marcaron con el kit de marcaje de proteínas Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) según las instrucciones del fabricante.

Las esferas se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% como se indicó anteriormente, y después se resuspendieron en 1 ml de PBS, Tween 20 al 0,1%, y se analizaron 10.000 acontecimientos empleando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

Como puede observarse en la figura 9, el resto de biotina confinada se libera tras una irradiación con UV y se une a las esferas. Se observó un aumento en 19 veces de la fluorescencia media de las esferas después de la reacción catalizada por GST M2-2 de biotina- β ala-GSH confinada con CDNB incluso en ausencia de irradiación con UV. Esto se correlaciona con la presencia aparente de biotina- β ala-GSH aproximadamente al 4% en la preparación de biotina- β ala-GSH confinada, según se determina utilizando una fluorimetría para medir el desplazamiento del ácido 2-anilonaftalen-6-sulfónico (2,6-ANS) de la avidina (Mock *et al.*, 1985). Estos resultados son coherentes con la inmovilización de fondo previamente observada de la avidina confinada a la avidina "en la oscuridad" (es decir, sin iluminación UV), que es tan alta como del 15% de la señal observada después de la iluminación (Sundberg *et al.*, 1995). La señal "oscura" observada previamente fue atribuida a trazas de contaminantes de biotina en la preparación de biotina confinada, o a interacciones débiles entre la avidina y los componentes de la biotina confinada, incluyendo el conector (Sundberg *et al.*, 1995). Después de la irradiación con UV se observó una gran diferencia en la fluorescencia media de las esferas incubadas en presencia y en ausencia de GST. La fluorescencia media de las esferas con GST era 84 veces y 56 veces la observada sin GST con CDNB y CNB como sustratos, respectivamente (figura 9).

Ejemplo 6.

La glutatión S-transferasa M2-2 (GST M2-2) compartimentalizada en las gotas acuosas de una emulsión de agua en aceite cataliza la reacción del glutatión biotinilado confinado con 4-cloro-3-nitrobenzoato (CNB). El producto biotinilado confinado generado permanece compartimentalizado, y después puede liberarse mediante irradiación con UV en los compartimentos, capturarse sobre una esfera revestida con avidina en el mismo compartimento, y las esferas revestidas con el producto pueden detectarse mediante citometría de flujo.

Se centrifugaron partes alícuotas de 20 μ l (4×10^8 esferas) de microesferas marcadas con neutravidina no fluorescentes de 1,0 μ m de diámetro (Molecular Probes, F-8777) o esferas de poliestireno revestidas con estreptavidina de 0,93 μ m de diámetro (Bangs Laboratories) en una microcentrífuga a 2.600 g (6.500 rpm) durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y las esferas se resuspendieron, en hielo, en 20 μ l de KH_2PO_4 0,1 M, pH 6,5, EDTA 1

mM, ditiotreitolo 2 mM, biotina- β ala-GSH confinada 50 μ M, que contenía 3 μ g de GST M2-2 humana recombinante purificada o no contenía enzima.

Entonces se emulsionaron seis mezclas de reacción fundamentalmente como en Tawfik y Griffiths (1998):

- a) esferas de Bangs, sin GST
 - 5 b) esferas de Bangs, con GST
 - c) esferas de Molecular Probes, sin GST
 - d) esferas de Molecular Probes, con GST
 - e) esferas de Bangs, sin GST
 - f) esferas de Molecular Probes, con GST
- 10 La fase oleosa se preparó en el acto disolviendo Span 80 al 4,5% (en v/v) (Fluka) en aceite mineral (Sigma, nº M-5904), seguido de Tween 80 al 0,5% (en v/v) (SigmaUltra, nº P-8074). Las mezclas de reacción enfriadas en hielo se añadieron gradualmente (en 5 partes alícuotas de 4 μ l a lo largo de aproximadamente 2 minutos) a 0,4 ml de la fase oleosa enfriada en hielo en un vial Biofreeze de 5 ml (Costar, nº 2051) mientras se agitaba con una barra magnética (8 x 3 mm con un anillo pivotal; Scientific Industries International, Loughborough, Reino Unido). La agitación (a 1150 rpm)
- 15 rpm) continuó durante 1 minuto más en hielo.
- Se añadieron 8 μ l de la emulsión d) a 0,4 ml de la emulsión e), y se añadieron 8 μ l de la emulsión b) a 0,4 ml de la emulsión f) (para producir diluciones 1:50), y las mezclas de emulsiones se agitaron en vórtice durante 5 segundos para que se mezclaran.
- Seis mezclas de reacción se dejaron sin emulsionar:
- 20 a) esferas de Bangs, sin GST
 - b) esferas de Bangs, con GST
 - c) esferas de Molecular Probes, sin GST
 - d) esferas de Molecular Probes, con GST
 - e) esferas de Bangs, sin GST
 - 25 f) esferas de Molecular Probes, con GST
- Se añadieron 0,4 μ l de d) a 20 μ l de e), y se añadieron 0,4 μ l de b) a 20 μ l de f) (para producir diluciones 1:50).
- Tanto las emulsiones como las reacciones no emulsionadas se incubaron durante 15 min a 25 °C. Después se añadieron 0,8 μ l de CNB 500 mM (en etanol absoluto) a cada 0,4 ml de emulsión y la emulsión se agitó en vórtice durante 5 segundos (el CNB se traslada a través del aceite mineral hacia los compartimentos acuosos). Se
- 30 añadieron 5 μ l de CNB 5 mM (en KH_2PO_4 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 6,5) a las reacciones no emulsionadas.
- Todas las reacciones se incubaron durante 4 horas a 25 °C.
- El pH de las gotas acuosas se disminuyó para extinguir la reacción catalizada por GST mediante la agitación en vórtice de las emulsiones con 200 μ l de aceite mineral Sigma Mineral Oil for Molecular Biology (M-5904) que contenía Span 80 al 4,5% (Fluka), Tween 80 al 0,5% (Sigma Ultra) en Sigma Mineral Oil for Molecular Biology, y
- 35 ácido acético 25 mM. Las reacciones no emulsionadas se extinguieron añadiendo 25 μ l de ácido acético 0,5 M.
- Todas las reacciones se trasladaron a una placa de fondo plano de 24 pocillos (Corning, nº 25820) que flotaba sobre agua helada y se irradiaron durante 2 min con una bombilla de UV B 100 AP (UVP) mantenida a una distancia de aproximadamente 6 cm. Todas las muestras después se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.
- Las emulsiones se trasladaron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, se centrifugaron durante 1 min, 13,5k rpm en una microcentrífuga, y la fase oleosa se retiró dejando la emulsión concentrada (pero aún intacta) en el fondo del tubo. Se añadieron 200 μ l de acetato de Na 0,1 M, pH 5,0, y la emulsión se rompió extrayendo 4 veces con 1 ml de hexano, agitando en vórtice entre cada adición de hexano. El hexano residual se retiró centrifugando durante 10 min a temperatura ambiente al vacío en un Speedvac (Farmingdale, NY).
- Entonces todas las muestras se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% en una placa de filtro MultiScreen-HV de 0,45 μ m (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado. Las esferas
- 45 después se resuspendieron en 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1%. Se añadieron 25 μ l (aproximadamente 5×10^7

esferas) a 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% que contenía anticuerpo anti-DNP marcado con Alexa-488 20 ng/µl o anticuerpo anti-CNB marcado con Alexa-488 20 ng/µl (véase el ejemplo 5) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las esferas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% como se indicó anteriormente, después se resuspendieron en 1 ml de PBS, Tween 20 al 0,1%, y se analizaron 300.000 acontecimientos utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

En las mezclas no emulsionadas, en las que la GST y el producto de la reacción catalizada por GST (biotina-βala-NB confinada) no estaban compartimentalizados, todas las esferas tienen una fluorescencia baja similar (figura 10, paneles B y D). En contraste, en las mezclas de emulsiones, en las que la GST y el producto de la reacción catalizada por GST (biotina-βAla-NB confinada) están compartimentalizados, dos poblaciones de esferas, una de baja fluorescencia y otra de fluorescencia más alta, son claramente visibles (figura 10, paneles C y E). El establecimiento de ventanas R1 y R2 permite separar en gran medida las esferas de Bangs y de Molecular Probes basándose en sus características de dispersión de luz ligeramente diferentes (figura 10, panel A). La proporción de esferas de Bangs a esferas de Molecular Probes que pasan a través de R1 es del 68%:0,1%, y la proporción que pasa a través de R2 es del 0,08%:87%. Utilizando estas ventanas resulta evidente que las esferas con alta fluorescencia son las que estaban compartimentalizadas con la enzima GST. Por tanto, la compartimentación de las esferas, las enzimas y los productos de reacción se obtuvo mediante la emulsificación, y las esferas presentes en compartimentos que contienen enzimas pueden distinguirse de las que no mediante sus características de fluorescencia.

Ejemplo 7.

La GST M2-2 humana puede transcribirse y traducirse *in vitro* en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite y cataliza la reacción que produce un cambio en las propiedades de fluorescencia de las microesferas compartimentalizadas.

El gen que codifica la glutatión S-transferasa M2-2 humana (GST M2-2) se amplifica mediante PCR utilizando los oligonucleótidos GSTM2-2Fo y GSTM2-2Bc a partir de un clon de ADNc de GST M2-2 humana en pGEM-3Z (Baez *et al.*, 1997). El fragmento de PCR se clona en el vector pGEM-4Z (Promega) digerido con *Hind*III y *Kpn*I cadena abajo del promotor *lac* y el promotor de la ARN polimerasa de T7. El oligonucleótido GSTM2-2Bc añade el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 cadena arriba del codon de inicio del gen de la metiltransferasa. La secuenciación del ADN identifica un clon con la secuencia de nucleótidos correcta, denominado pGEM-hGSTM2-2. El plásmido pGEM-hGSTM2-2 descrito se amplifica mediante PCR utilizando los cebadores LMB2 y LMB3 como se indicó anteriormente, para crear un fragmento de PCR de 826 pares de bases (GSTM2-2.LMB2-3) que porta el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, y el gen GST. El fragmento de PCR se purifica directamente utilizando Wizards PCR Preps (Promega).

Se centrifugaron partes alícuotas de 60 µl ($1,2 \times 10^9$ esferas) de microesferas marcadas con neutravidina no fluorescentes de 1,0 µm de diámetro (Molecular Probes, F-8777) en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y las esferas se resuspendieron, en hielo, en 60 µl de un sistema de transcripción/traducción acopladas *in vitro* procariota diseñado para moldes lineales (Lesley, Brow y Burgess, 1991). Se emplea una preparación comercial de este sistema (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ácido acético 12,5 mM (para disminuir el pH hasta aproximadamente 7,0), ARN polimerasa de T7 (2.000 unidades), ADN λ digerido con *Hind*III 12,5 µg/ml (New England Biolabs), biotina-βala-GSH confinada 50 µM y, opcionalmente, ADN GSTM2-2.LMB2-3 5 nM o 5,0 µg de GST M2-2 humana recombinante purificada por 50 µl (o sin ninguno de éstos).

Se retiró una parte alícuota de 5 µl de cada mezcla de reacción y se dejó sin emulsionar. Se emulsionaron 50 µl del resto de la mezcla de reacción fundamentalmente como en Tawfik y Griffiths (1998).

La fase oleosa se preparó en el acto disolviendo Span 80 al 4,5% (en v/v) (Fluka) en aceite mineral (Sigma, nº M-5904), seguido de Tween 80 al 0,5% (en v/v) (SigmaUltra, nº P-8074). Las mezclas de reacción enfriadas en hielo se añadieron gradualmente (en 5 partes alícuotas de 10 µl a lo largo de aproximadamente 2 minutos) a 1,0 ml de la fase oleosa enfriada en hielo en un vial Biofreeze de 5 ml (Costar, nº 2051) mientras se agitaba con una barra magnética (8 x 3 mm con un anillo pivotal; Scientific Industries International, Loughborough, Reino Unido). La agitación (a 1150 rpm) continuó durante 1 minuto más en hielo.

Tanto las emulsiones como las reacciones no emulsionadas se incubaron durante 45 min a 25 °C para permitir que se desarrollase la traducción. Después se añadieron 5 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) 100 mM (en etanol absoluto) a cada 1,0 ml de emulsión y la emulsión se agitó en vórtice durante 5 segundos (el CDNB se traslada a través del aceite mineral hacia los compartimentos acuosos). Se añadió 1,0 µl de CDNB 2,5 mM (en agua) a las reacciones no emulsionadas. El CDNB inhibe la traducción *in vitro* y, añadiéndolo de esta manera, después de completar la traducción, se maximiza el rendimiento de GST.

Todas las reacciones se incubaron durante 30 min a 25 °C. El pH de las gotas acuosas después se disminuyó para extinguir la reacción mediante la agitación en vórtice de las emulsiones con 500 µl de aceite mineral Sigma Mineral

Oil for Molecular Biology (M-5904) que contenía Span 80 al 4,5% (Fluka), Tween 80 al 0,5% (Sigma Ultra) en Sigma Mineral Oil for Molecular Biology, y ácido acético 25 mM. Las reacciones no emulsionadas se extinguieron añadiendo 5 µl de ácido acético 0,5 M y 20 µl de acetato de Na 0,1 M, pH 5,0.

Todas las reacciones se trasladaron a una placa de fondo plano de 24 pocillos (Corning, nº 25820) que flotaba sobre agua helada y se irradiaron durante 2 min con una bombilla de UV B 100 AP (UVP) mantenida a una distancia de aproximadamente 6 cm. Todas las muestras después se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.

Las emulsiones se trasladaron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, se centrifugaron durante 1 min, 13,5k rpm en una microcentrífuga, y la fase oleosa se retiró dejando la emulsión concentrada (pero aún intacta) en el fondo del tubo. Se añadieron 200 µl de acetato de Na 0,1 M, pH 5,0, y la emulsión se rompió extrayendo 4 veces con 1 ml de hexano, agitando en vórtice entre cada adición de hexano. El hexano residual se retiró centrifugando durante 10 min a temperatura ambiente al vacío en un Speedvac (Farmingdale, NY).

Entonces aproximadamente 5×10^7 esferas procedentes de las emulsiones rotas y de las reacciones no emulsionadas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% en una placa de filtro MultiScreen-HV de 0,45 µm (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado. Las esferas después se resuspendieron en 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% que contenía anticuerpo anti-DNP marcado con Alexa-488 10 ng/µl (véase el ejemplo 5) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las esferas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% como se indicó anteriormente, después se resuspendieron en 1 ml de PBS, Tween 20 al 0,1%, y se analizaron 10.000 acontecimientos utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

Como puede observarse en la figura 11, en las reacciones emulsionadas y no emulsionadas, la reacción catalizada por GST M2-2 traducida *in vitro* produce esferas con mayor fluorescencia que cuando no está presente la enzima. Pero esta diferencia en la fluorescencia no sería suficiente para una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) eficaz. Sin embargo, las esferas de las reacciones emulsionadas y no emulsionadas que contenían 5,0 µg de GST M2-2 recombinante purificada por 50 µl eran incluso más fluorescentes que las que contenían la GST M2-2 traducida *in vitro*, lo cual permite un enriquecimiento eficaz en estas esferas mediante FACS de las incubadas en ausencia de GST. Esto imita la situación en que una GST mutante de mayor actividad que el tipo salvaje se traduce *in vitro*.

Ejemplo 8.

Los genes unidos a las microesferas se expresan *in vitro* y el producto génico resultante (una enzima) se une a las microesferas pero mantiene la actividad catalítica.

Un formato para la selección de elementos genéticos es en el que el elemento genético comprende un gen conectado a una microesfera, que se traduce en una microcápsula, y el producto génico traducido se vuelve a acoplar sobre la microesfera dentro de la microcápsula. Así, la compartimentación conduce a la formación de complejos de productos génicos (por ejemplo, proteínas o enzimas) unidos al gen que los codifica. Estos complejos después pueden seleccionarse para la unión a un ligando (véase el ejemplo 12), o para la actividad enzimática a través de una segunda reacción compartimentalizada.

A continuación se demuestra que una enzima (fosfotriesterasa o PTE) puede transcribirse y traducirse *in vitro* a partir de genes unidos a microesferas, y la enzima traducida se vuelve a unir a las microesferas. También se demuestra que la enzima traducida puede modificarse, ensamblarse o complementarse con un cofactor, mientras que está unida a las esferas; en este ejemplo, se añaden iones metálicos a la apoenzima para producir una metaloenzima activa. Además, se demuestra que la actividad catalítica de la enzima se mantiene mientras está unida a la microesfera, junto con el gen que la codifica.

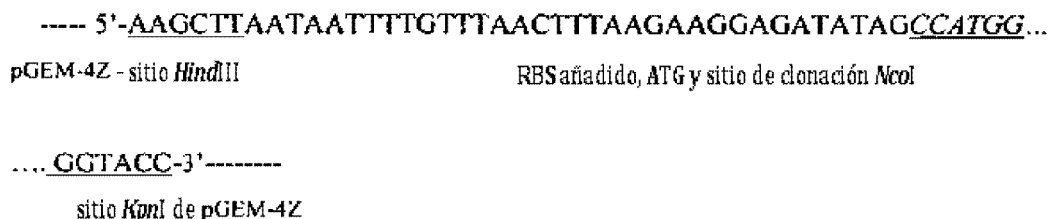
El gen *opd* que codifica una fosfotriesterasa (PTE, también conocida como paraoxón hidrolasa; Mulbry y Karns, 1989) se amplifica a partir de *Flavobacterium* sp. cepa ATCC 27551 mediante PCR utilizando un cebador directo que añade codones de fin y un sitio *EcoRI* (OPD-Fo; véase la tabla 1), y un cebador inverso que añade el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 (RBS) y un sitio de clonación *HindIII* (OPD-Bc). Este ADN se clona en pGEM-4Z utilizando los sitios *HindIII* y *EcoRI* cadena abajo del promotor de la ARN polimerasa de T7. La secuencia del ADN identifica un clon que tiene la secuencia de nucleótidos correcta. Se ha descubierto que bacterias (*E. coli*, TG1) transformadas con este clon (Gem-OPD) sobreexpresan la PTE activa cuando se cultivan en presencia de cloruro de cobalto y se inducen con IPTG (Omburo *et al.*, 1992).

El gen OPD también se clona con un péptido FlagTM (Met -Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys; Sigma-Aldrich) añadido a su extremo N-terminal. El gen OPD se amplifica en *Flavobacterium* sp. cepa ATCC 27551 mediante PCR utilizando un cebador directo (N-Flag-OPD-Fo) que añade codones de fin y un sitio *KpnI*, y un cebador inverso (N-Flag-OPD-Bc) que añade un sitio *NcoI*, un péptido Flag, y un conector corto entre el péptido Flag y el marco de lectura de OPD. El fragmento de ADN resultante se clona en el plásmido pGEM-4Z^{NcoI} (utilizando los sitios *KpnI* y *NcoI*). El plásmido pGEM-4Z^{NcoI} es una modificación de pGEM-4Z en el que se añade el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 (RBS) y un codón de inicio ATG cadena abajo del promotor de la ARN polimerasa

de T7, para crear un sitio *NcoI* que permite la clonación de los marcos de lectura en el contexto del RBS y del codón ATG. La secuencia de la sección incorporada a pGEM-4Z (entre los sitios *HindIII* y *KpnI* cadena abajo del promotor de la ARN polimerasa de T7) para producir pGEM-4Z^{NcoI} se indica en el esquema 1.

El resto de pGEM-4Z, incluyendo los sitios de clonación *KpnI* y *EcoRI*, permanece intacto.

5 Esquema 1



La secuenciación del ADN identifica un clon que tiene la secuencia de nucleótidos correcta. Se ha descubierto que bacterias transformadas con este clon (Gem-N-Flag-OPD) sobreexpresan una PTE activa cuando se cultivan en presencia de cloruro de cobalto y se inducen con IPTG.

10 Los plásmidos gem-OPD y gem-N-Flag-OPD descritos anteriormente se amplifican mediante PCR, utilizando los cebadores LMB2-biotina y LMB3, para crear fragmentos de ADN (OPD.LMB3-2biotina y N-Flag-OPD.LMB3-2biotina, respectivamente) que portan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, y los genes OPD o N-Flag-OPD, y están marcados con biotina en el extremo 3'. Los fragmentos de PCR se purifican directamente utilizando Wizard PCR Preps (Promega).

15 Se centrifugan partes alícuotas de una suspensión de microesferas marcadas con estreptavidina no fluorescentes de 0,95 µm (Bangs, aproximadamente 2×10^7 esferas por µl de suspensión) en una microcentrífuga a 10.000 g (13.500 rpm) durante 3 min. El sobrenadante se retira y las esferas se resuspenden en tampón TNT (Tris 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%). Se añade un anticuerpo que es capaz de unirse a péptidos Flag amino-terminales y que está marcado mediante biotilación (BioM5, un anticuerpo anti-Flag marcado con biotina; Sigma) a la
 20 suspensión de esferas a una media de 4×10^4 moléculas de anticuerpo por esfera. La mezcla resultante se incuba durante varias horas con mezclado ocasional. Las esferas se enjuagan dos veces mediante una centrifugación y una resuspensión en tampón TNT. Los fragmentos de ADN biotinilado (fragmentos OPD.LMB3-2biotina, N-Flag-OPD.LMB3-2biotina, o los fragmentos que portan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 y un gen que codifica una enzima diferente que también está marcado con el
 25 péptido N-Flag, por ejemplo metiltransferasa HaeIII - N-Flag-M.HaeIII.LMB3-2biotina) se añaden a la suspensión de esferas revestidas con anticuerpos, y la mezcla se incuba durante la noche a 4 °C. Las esferas se enjuagan 3 veces mediante una centrifugación y una resuspensión en tampón TNT.

Se centrifugaron partes alícuotas de 50 µl (aproximadamente 10^9 esferas) de la anterior suspensión de esferas en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y las esferas se resuspendieron con
 30 cuidado, en hielo, en 50 µl de un sistema de transcripción/traducción acopladas *in vitro* procariota diseñado para moldes lineales (Lesley *et al.*, 1991). Se emplea una preparación comercial de este sistema (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (2.000 unidades). Las reacciones se incuban a 25 °C durante 1,5 horas y se centrifugan en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min. El sobrenadante se retira y las esferas se resuspenden en 100 µl de Tris 50 mM, 10 mM de carbonato de potasio, pH
 35 8,0. Se añade una disolución acuosa de cloruro de cobalto a una concentración de 1 mM, y las reacciones se incuban durante varias horas a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C). Las esferas se enjuagan 4 veces mediante una centrifugación y una resuspensión en tampón TNT.

Se añaden partes alícuotas de las anteriores esferas a una disolución de paraoxón 0,25 mM en Tris 50 mM, pH 8,3. Las esferas se incuban a 25 °C con una agitación ocasional durante diferentes periodos de tiempo. Las esferas se
 40 centrifugan en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min, el sobrenadante se retira y su densidad óptica se mide a 405 nm. No se observa un cambio significativo en la densidad óptica, con relación a la densidad óptica observada bajo las mismas condiciones en ausencia de esferas o fosfotriesterasa, cuando las esferas a las que están unidos los fragmentos de ADN biotinilado OPD.LMB3-2biotina o N-Flag-M.HaeIII.LMB3-2biotina (y que se hacen reaccionar después como se describió anteriormente) se incuban con paraoxón. Sin embargo, se observa un cambio
 45 significativo en la densidad óptica a 405 nm cuando las esferas a las que están unidos los fragmentos de ADN biotinilado N-Flag-OPD.LMB3-2biotina (y que se hacen reaccionar después como se describió anteriormente) se incuban con paraoxón. Por ejemplo, cuando se añaden los fragmentos de ADN biotinilado N-Flag-OPD.LMB3-2biotina a una concentración de 1 nM (a 50 µl de una suspensión de esferas (aproximadamente 10^9 esferas) que después se resuspende en 50 µl de transcripción/traducción *in vitro*), y se hace reaccionar como se describió
 50 anteriormente, el cambio en la densidad óptica observado después de 3 horas se corresponde con más del 50% de

hidrólisis del paraoxón (a 0,25 mM en un volumen de reacción de 50 μ l). Por tanto, las microesferas que portan un gen que codifica una proteína con la actividad catalítica deseada (fosfotriesterasa en el anterior ejemplo) pueden distinguirse claramente de las microesferas que portan genes que no codifican una proteína con la actividad catalítica deseada (metiltransferasa *HaeIII* en el anterior ejemplo). Además, casi no se observa cambio en la densidad óptica a 405 nm cuando se unen a las esferas fragmentos de ADN biotinilado N-Flag-OPD.LMB3-2biotina y se hacen reaccionar como se describió anteriormente, excepto que no se añade cloruro de cobalto a las esferas resuspendidas después de la transcripción/traducción.

Estos resultados demuestran que una enzima (fosfotriesterasa) puede transcribirse y traducirse *in vitro* a partir de genes que codifican esta enzima y que están unidos a microesferas. Cuando los genes codifican un marcador (un péptido Flag N-terminal en el anterior ejemplo), la enzima traducida vuelve a unirse a las microesferas a las cuales están unidos los genes. Si es necesario, la enzima traducida pueden entonces modificarse mientras permanece unida a las microesferas (junto con el gen que la codifica); en este ejemplo, se añaden iones cobalto para producir una metaloenzima reactiva. Este resultado también indica que la enzima es catalíticamente activa mientras está unida a las microesferas junto con el gen que la codifica.

Ejemplo 9.

Una enzima cataliza una reacción con un sustrato biotinilado confinado, y el producto biotinilado confinado generado se libera mediante irradiación con UV y se captura sobre microesferas revestidas con estreptavidina. Después estas esferas se detectan mediante citometría de flujo.

Un formato para la selección de elementos genéticos es en el que el elemento genético comprende un gen unido a una microesfera, que se traduce en una microcápsula, y el producto génico traducido se acopla de nuevo sobre la microesfera dentro de la microcápsula. Por tanto, la compartimentación conduce a la formación de complejos de productos génicos (por ejemplo, proteínas o enzimas) unidos al gen que los codifica. Estos complejos después pueden seleccionarse para la unión a un ligando (véase el ejemplo 12), o para la actividad enzimática a través de una segunda reacción compartimentalizada.

Sin embargo, para que estos complejos puedan seleccionarse para la actividad catalítica, debería estar disponible un sustrato soluble para la enzima inmovilizada y, cuando la reacción catalítica se haya completado, el producto de la actividad enzimática que se está seleccionando debe unirse al gen que codifica esta enzima. Los complejos resultantes entonces deben clasificarse o seleccionarse en virtud del producto que está unido a ellos, por ejemplo utilizando un anticuerpo marcado con fluorescencia que reconozca el producto. En otros compartimentos que contienen complejos de genes y productos génicos que no codifican proteínas con la actividad enzimática deseada, el sustrato sin reaccionar debería unirse al gen. Estos complejos no estarán marcados con el producto y, por tanto, se rechazarán.

A continuación se demuestra que una enzima (fosfotriesterasa o PTE) puede reaccionar con un sustrato biotinilado confinado en presencia de esferas revestidas con estreptavidina. El producto biotinilado confinado generado puede entonces liberarse mediante irradiación con UV y capturarse sobre esferas revestidas de avidina. Después, estas esferas se detectan mediante citometría de flujo y son claramente distinguibles de esferas incubadas con un sustrato biotinilado confinado en presencia de otras enzimas o proteínas que no muestran actividad fosfotriesterasa.

Un sustrato biotinilado confinado para PTE (EtNP-Bz-Glu-biotina confinada; figura 12) se sintetiza como sigue:

Boc-5-aminopentanol: Se añade dicarbonato de di-terc-butilo (20,8 g, 0,095 mol) a una disolución agitada de 5-aminopentanol (10,37 g, 0,1 mol) en diclorometano (DCM) (200 ml) sobre hielo. Después de la adición, la disolución se vuelve turbia y se separa un jarabe. Se añade trietilamina (13,8 ml, 0,1 mol) gota a gota, y la disolución resultante se agita durante 10 minutos sobre hielo y después durante la noche a temperatura ambiente. Los disolventes se retiran al vacío, el jarabe resultante se disuelve en acetato de etilo (500 ml), se extrae 3 veces con Na_2HPO_4 1 M (pH 4), una vez con NaHCO_3 saturado y, por último, con salmuera, y después se seca sobre MgSO_4 . Los disolventes se retiran al vacío y el jarabe resultante (después de un secado a fondo al vacío en presencia de hidróxido de potasio), formado principalmente por Boc-5-aminopentanol, se emplea sin más purificación.

(11): Se añade trietilamina (3 ml, 22 mmol) gota a gota a una disolución agitada de fosfodichloridato de p-nitrofenilo (5,15 g, 20 mmol) y etanol (1,15 ml, 20 mmol) enfriado sobre hielo seco en acetona, a lo largo de 30 minutos. Se deja que la disolución se caliente lentamente hasta la temperatura ambiente y se agita durante 90 minutos más. Entonces se añade gota a gota una disolución de Boc-5-aminopentanol (4,3 g, aproximadamente 20 mmol) y trietilamina (3 ml, 22 mmol) en DCM (20 ml). La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añade 1*H*-tetrazol (0,35 g, 5 mmol) y la reacción se agita durante 2 horas más. Se añade DCM (100 ml) y la disolución se extrae 3 veces con Na_2HPO_4 1 M (pH 4), NaHCO_3 saturado y por último, con salmuera, y después se seca sobre MgSO_4 . Los disolventes se retiran al vacío para producir un jarabe que se purifica mediante una cromatografía en columna sobre sílice (disolvente: metanol del 1% al 2% en DCM) para producir 3,52 g de **11** (un jarabe).

Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-N-Boc-aminometilbenzoico: Se añade dicitlohexildicarbodiimida (DCC, 5,15 g, 25 mmol) a una suspensión agitada del ácido 4-N-Boc-aminometilbenzoico (Tiger, Monmouth, NJ; 5,2

g, 25 mmol) y N-hidroxisuccinimida (2,88 g, 25 mmol) en DCM (200 ml) más acetonitrilo (20 ml). La reacción se agita durante la noche a 4 °C y después durante 3 horas a temperatura ambiente. El precipitado de dicitclohexilurea se retira mediante filtración, y el filtrado se concentra al vacío para producir un jarabe. El jarabe se disuelve en cloroformo y DCM, y se trata con carbón activado. La adición de éter produce un sólido cristalino blanco. Una

(12): Se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 4 ml) a una disolución de **11** (900 mg, 2,07 mmol) en DCM (5 ml). La disolución se dejó a temperatura ambiente durante 45 minutos, y los disolventes se retiraron al vacío. El jarabe residual se tritura mediante su disolución en DCM y metanol y la adición de éter. El **12** resultante (como la sal TFA, un jarabe) se seca al vacío en presencia de hidróxido de potasio, y después se hace reaccionar inmediatamente sin más purificación (véase a continuación).

(13): Se añade el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-N-Boc-aminometilbenzoico (670 mg, 2,2 mmol) y trietilamina (0,345 ml, 2,5 mmol) a **12** (véase anteriormente) en DCM (15 ml). La disolución se agita durante 30 minutos, se añade trietilamina (0,1 ml, 0,72 mmol), y la disolución se agita durante 3 horas más. Se añade DCM (20 ml), y la disolución se extrae dos veces con Na_2HPO_4 1 M (pH 4), una vez con NaHCO_3 saturado y, por último, con salmuera, y después se seca sobre MgSO_4 . Los disolventes se retiran al vacío para producir un jarabe que se purifica mediante una cromatografía en columna sobre sílice (disolvente: metanol al 5% en DCM) para producir 0,86 g de **13** (un jarabe).

(14): Se trataron 0,84 g de **13** (1,6 mmol) con TFA según se describió anteriormente para producir **14** (como la sal TFA, un jarabe) que se hace reaccionar inmediatamente como se describe a continuación.

(15): Se añade Boc-Glu(OSu)-OBu^t (Bachem, 641 mg, 1,6 mmol) y trietilamina (0,235 ml, 1,7 mmol) a **14** (véase anteriormente) en DCM (15 ml). La disolución se agita durante 1 hora, se añade trietilamina (60 µl, 0,43 mmol), y la disolución se agita durante 1 hora. Se añade DCM (20 ml), y la disolución se extrae dos veces con Na_2HPO_4 1 M (pH 4), una vez con NaHCO_3 saturado y, por último, con salmuera, y después se seca sobre MgSO_4 . Los disolventes se retiran al vacío para producir un jarabe que se purifica mediante una cromatografía en columna sobre sílice (disolvente: metanol al 7% en DCM) para producir 0,8 g de **15** (un sólido cristalino blanco).

EtNP-Bz-Glu (16): Se disolvieron 0,4 g de **15** (0,56 mmol) en DCM (5 ml) y TFA (5 ml). La disolución se agita durante 1 hora a temperatura ambiente, y los disolventes se retiran al vacío. El jarabe residual se cristaliza mediante su disolución en metanol y la adición de éter. Una recrystalización (en metanol y éter) produce 200 mg de **16** (como la sal TFA, un sólido blanco).

EtNP-Bz-Glu-biotina confinada (17): Se añadió carbonildimidazol (6 mg, 37,5 µmol) a una disolución de MeNPO-CO-biotina-OH (**5**, 17 mg, 35 µmol) en DMF (1 ml). La disolución se agita durante 60 minutos a temperatura ambiente y se añade a **16** (20 mg, 30 µmol). Se añade trietilamina (5,5 µl, 40 µmol), DMF (1 ml) y agua (0,5 ml) a la mezcla de reacción agitada hasta que se vuelve transparente. La disolución se agita durante 2 horas a temperatura ambiente y se conserva a -20 °C.

El producto de la anterior reacción se purificó mediante una HPLC en fase inversa en una columna preparativa C8 utilizando un gradiente de agua-acetonitrilo en presencia de ácido trifluoroacético al 0,1%. El pico que corresponde a **17** (tiempo de retención = 23,1 minutos) se recoge. El producto se aísla mediante liofilización como un sólido amarillo. El análisis del producto después de la purificación mediante HPLC utilizando una HPLC en fase inversa analítica indicó un producto principal (>80%), cuyo espectro de UV corresponde a **17**. De modo específico, λ^{max} a 355 nm indica la presencia del grupo O-metilnitropiperonilcarbonilo de la biotina confinada (Pirrung y Huang, 1996), y un "hombro" a 277 nm, ausente en la biotina confinada, indica la presencia del éster fosfato de p-nitrofenilo de **17**. La concentración de **17** se verifica mediante la hidrólisis del éster fosfato de p-nitrofenilo en hidróxido de potasio 0,1 M y determinando la cantidad de p-nitrofenol liberado (densidad óptica a 405 nm).

Se descubrió que **17** purificado también es un sustrato para PTE, que conduce a la liberación de p-nitrofenol (figura 13, controlado por el cambio en la densidad óptica a 405 nm) con unas velocidades que son sólo 6 veces más lentas que las observadas con el paraoxón. De manera notable, a diferencia de la hidrólisis catalizada con bases de **17**, que se desarrolla hasta que se completa (y la hidrólisis catalizada por PTE del paraoxón), la hidrólisis catalizada por PTE de **17** se desarrolla con velocidades significativas sólo hasta que la mitad del sustrato ha sido hidrolizado. La segunda mitad del sustrato también puede hidrolizarse, pero sólo en presencia de cantidades mucho mayores de PTE y después de incubaciones largas (de varias horas a toda la noche). Esto probablemente es debido al hecho de que **17** está formado por dos diastereómeros (que corresponden a dos enantiómeros con respecto al fosfotriéster quiral), de los cuales sólo uno es un sustrato eficaz para la enzima. En efecto, previamente se ha observado estereoselectividad con PTE y otros fosfotriésteres quirales (Hong y Raushel, 1999).

Se generan anticuerpos que reconocen etil fosfodiésteres que son los productos de la hidrólisis de los correspondientes fosfotriésteres de p-nitrofenilo. Para este fin, se sintetiza un derivado de etil fosfodiéster adecuado y se conjuga con proteínas vehículo tal como se describe a continuación (figura 14).

EtNPBG (18): Se añade anhídrido glutárico (180 mg, 1,6 mmol) y trietilamina (0,22 ml, 1,6 mmol) a **12** (preparado mediante la desprotección de 1,6 mmol de **11**, según se describió anteriormente) en DCM (25 ml). La disolución se agita durante 20 minutos, se añade trietilamina (0,12 ml, 0,85 mmol), y la disolución se agita durante 1 hora más. Se añade DCM (20 ml), y la disolución se extrae dos veces con Na₂HPO₄ 1 M (pH 4) y después se seca sobre MgSO₄. Los disolventes se retiran al vacío para producir un jarabe que se purifica mediante una cromatografía en columna sobre sílice (disolvente: metanol al 12,5% en DCM más ácido acético al 0,1%) para producir 445 mg de **18** (un jarabe).

Sustratos conjugados de EtNPBG-KLH y EtNPBG-KLH: Se añade carbonildiimidazol (CDI, 32 mg, 200 µmol) a una disolución de **18** (60 mg, 134 µmol) en DMF (1 ml). La disolución se agita durante 60 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añaden partes alícuotas de **18** activado a disoluciones 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa (KLH) en tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0 (de 0,5 a 4 µmol de **18** por mg de proteína). Las reacciones se agitan durante 1 hora a temperatura ambiente, y los conjugados de proteínas resultantes se dializan a fondo contra disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C. El nivel de conjugación (densidad de hapteno o Hd) se determinó mediante la hidrólisis de una muestra de los conjugados dializados en hidróxido de potasio 0,1 M y el control de la cantidad de p-nitrofenol liberado (a 405 nm). Se descubrió que era de 8,5 a 24 moléculas de EtNPBG por molécula de BSA, y de 14 a 63 por molécula de KLH, dependiendo de la cantidad de **18** activado añadida a las muestras de proteína.

Productos conjugados de EtBG-KLH y EtBG-KLH: Los conjugados de EtNPBG-KLH y EtNPBG-KLH descritos anteriormente se dializan contra carbonato 0,1 M, pH 11,8, durante 44 horas a temperatura ambiente, y después a fondo contra PBS (a 4 °C).

Anticuerpos anti-EtBG: Se producen en conejos inmunizados con EtBG-KLH (Hd =14) utilizando protocolos publicados (Tawfik *et al.*, 1993; Tawfik *et al.*, 1997) (obsequio del profesor Z. Eshhar, Weizmann Institute of Science, Rehovot). Los sueros se ensayaron mediante ELISA para la unión al sustrato conjugado de EtNPBG-BSA (Hd = 8,5) y el correspondiente producto conjugado (EtBG-BSA, Hd = 8,5). El primer sangrado de los conejos inmunizados (cuando la dilución es en 500 veces o mayor) mostró la selectividad deseada, produciendo una señal alta cuando se incubaba con el producto conjugado y muy poco efecto de fondo (<20%) con el sustrato conjugado. La dilución del suero en tampón COVAp (NaCl 2 M, MgSO₄·7H₂O 10 g/l, Tween 20 al 0,04%, fosfato 10 mM, p-nitrofenol 0,1 mM, pH 6,5) aumenta aún más la selectividad, bajando los niveles del fondo por debajo de 5%. El suero anti-EtBG se purificó utilizando una columna de proteína A HiTrap (Pharmacia). Los anticuerpos de conejo purificados se marcaron con el kit de marcaje de proteínas Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) según las instrucciones del fabricante.

Se centrifugan 10 µl (aproximadamente 2 x 10⁸ esferas) de microesferas revetidas con estreptavidina de 0,95 µm (Bangs, aproximadamente 2 x 10⁷ esferas por µl de suspensión) en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min, y se retiró el sobrenadante. Las esferas se resuspendieron en 10 µl de Tris 50 mM, pH 8,3, que contiene EtNP-Bz-Glu-biotina confinada (**17**) para producir una concentración final de 10 µM, 20 µM o 30 µM. La PTE se expresa *in vitro* mediante la transcripción/traducción de fragmentos de ADN OPD.LMB3-2biotina (a 5 nM). Se emplea una preparación comercial de este sistema (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (2.000 unidades), y las reacciones se incuban a 25 °C durante 1,5 horas. La PTE entonces se ensambla mediante la adición de carbonato de potasio (10 mM) y cloruro de cobalto (1 mM) en tampón Tris (10 mM, pH 8,0) e incubando durante la noche a 4 °C. Otra enzima, que no muestra actividad fosfotriesterasa, la metiltransferasa HaeIII, también se expresa *in vitro* mediante la transcripción/traducción de fragmentos de ADN M.HaeIII.LMB3-2biotina (a 5 nM), y después se trata con carbonato y cobalto como con la PTE. Se añaden partes alícuotas de 5 µl de las anteriores mezclas de reacción a las suspensiones de esferas y las reacciones se incuban durante 1 hora a 25 °C en la oscuridad. La reacción se detiene mediante la adición de 15 µl de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0, y se trasladan a hielo. Cada reacción entonces se divide en dos partes alícuotas de 15 µl cada una, una de las cuales se coloca como una gota sobre una capa de parafilm sobre la superficie de un bloque de aluminio enfriado en hielo. Esta parte alícuota entonces se irradia durante 2 min con una bombilla de UV B 100 AP (UVP) mantenida a una distancia de aproximadamente 6 cm. La otra parte alícuota se deja en la oscuridad. Todas las muestras de esferas entonces se incuban durante 30 min a temperatura ambiente y se lavan tres veces con 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% en un filtro de placas MultiScreen-HV de 0,45 µm (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado. Entonces las esferas (aproximadamente 2 x 10⁷) se resuspenden en 200 µl de COVAp que contiene anticuerpos anti-EtBG de conejo marcados con Alexa-488 100 ng/µl y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente y después durante 1 hora a 4 °C. Las esferas se lavan tres veces con 200 µl de PBS, Tween 20 al 0,1% como se indicó anteriormente, y después se resuspenden en 1 ml de PBS, Tween 20 al 0,1%, y se analizan 10.000 acontecimientos utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

Como puede observarse en la figura 15, se observa un aumento en hasta 20 veces en la fluorescencia media de las esferas tras la hidrólisis catalizada por PTE de EtNP-Bz-Glu-biotina confinada en presencia de esferas revetidas con estreptavidina y después de una irradiación con UV. Este aumento se observa con relación a esferas tratadas fundamentalmente de la misma manera pero en presencia de otra enzima (*M.HaeIII*), sin actividad fosfotriesterasa. De manera notable, las diferencias en la señal de fluorescencia se observan cuando la PTE y la *M.HaeIII* se expresan *in vitro* a partir de los correspondientes genes y se añaden junto con el contenido completo de la mezcla

de reacción de transcripción/traducción *in vitro*.

A altas concentraciones de sustrato, la fluorescencia media observada es menor que la observada a 20 μM . Además, a concentraciones de sustrato mayores que 20 μM , fundamentalmente no existe diferencia en la señal de fluorescencia entre las reacciones mantenidas en la oscuridad y las irradiadas con UV (los datos no se muestran). Puesto que las esferas, bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente, comienzan a mostrar saturación de la señal de unión a concentraciones mayores que 10 μM (del producto, según se detecta por la posterior adición de anticuerpos anti-EtBG marcados con fluorescencia), estos resultados pueden explicarse por la presencia de una contaminación de EtNP-Bz-Glu-biotina en la preparación de EtNP-Bz-Glu-biotina confinada. Estos resultados también son coherentes con la inmovilización del fondo, previamente observada, de la biotina confinada a la avidina "en la oscuridad" (es decir, sin iluminación UV), que es tan alta como del 15% de la señal observada después de la iluminación (Sundberg *et al.*, 1995). La señal "oscura" observada previamente se atribuye a trazas de contaminantes de biotina en la preparación de biotina confinada, o a interacciones débiles entre la avidina y los componentes de la biotina confinada, incluyendo el conector (Sundberg *et al.*, 1995). Ambos mecanismos pueden ser los responsables del hecho de que a altas concentraciones de sustrato biotinilado confinado (y por encima de la capacidad de unión de las esferas), la señal "oscura" se convierte en significativa. No obstante, a concentraciones de sustrato de 20 μM o menores, la señal "oscura" constituye sólo 25% o incluso menos del 10% (por ejemplo, a EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 10 μM) de la señal iluminada. Esto indica que la mayor parte de la hidrólisis catalizada por PTE de EtNP-Bz-Glu-biotina confinada se produce cuando el sustrato están en disolución y no unido a las esferas, y que el producto resultante (Et-Bz-Glu-biotina confinada), después de la iluminación con luz UV, se libera y se inmoviliza sobre las microesferas.

Ejemplo 10.

Los genes unidos a esferas se expresan *in vitro* y los productos génicos resultantes (enzimas) se inmovilizan sobre las microesferas pero mantienen la actividad catalítica. La enzima inmovilizada cataliza una reacción con un sustrato biotinilado confinado, y el producto biotinilado confinado resultante después es liberado por irradiación con UV y se une a estas esferas junto con el gen que codifica la enzima que condujo a su formación. Después estas esferas se detectan mediante citometría de flujo.

Un formato para la selección de elementos genéticos es en el que el elemento genético comprende un gen unido a una microesfera, que es traducido en una microcápsula, y el producto génico traducido se vuelve a acoplar a la microesfera dentro de la microcápsula. Por tanto, la compartimentación conduce a la formación de complejos de productos génicos (por ejemplo, proteínas y enzimas) unidos al gen que los codifica. Estos complejos posteriormente pueden seleccionarse para la unión a un ligando (véase el ejemplo 12), o para la actividad enzimática a través de una segunda reacción de compartimentación.

Para que estos complejos puedan seleccionarse para la actividad catalítica, debería estar disponible un sustrato soluble para la enzima inmovilizada y, cuando la reacción catalítica se haya completado, el producto de la actividad enzimática que se está seleccionando debe unirse al gen que codifica esta enzima. Los complejos resultantes entonces deben clasificarse o seleccionarse en virtud del producto que está unido a ellos, por ejemplo utilizando un anticuerpo marcado con fluorescencia que reconozca el producto. En otros compartimentos que contienen complejos de genes y productos génicos que no muestran la actividad enzimática deseada, el sustrato sin reaccionar debería unirse al gen. Estos complejos no estarán marcados con el producto y, por tanto, se rechazarán.

A continuación se demuestra que una enzima (fosfotriesterasa o PTE) puede transcribirse y traducirse *in vitro* a partir de genes unidos a microesferas, y que la enzima traducida se vuelve a unir a las microesferas. La enzima traducida entonces puede modificarse para que incorpore el sitio activo de cobalto, y se mantiene su actividad catalítica mientras está unida a la microesfera, junto con el gen que la codifica. La PTE inmovilizada posteriormente reacciona con un sustrato biotinilado confinado, y el producto biotinilado confinado generado se libera mediante irradiación con UV y se captura sobre las mismas esferas revestidas de avidina a las que está unido el gen que codifica la PTE. Después, estas esferas se detectan mediante citometría de flujo y son claramente distinguibles de esferas que portan un gen que codifica una proteína que no muestra actividad fosfotriesterasa.

Se centrifugan partes alícuotas de una suspensión de microesferas revestidas con estreptavidina de 0,95 μm (Bangs, aproximadamente 2×10^7 esferas por μl de suspensión) en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min. El sobrenadante se retira y las esferas se resuspenden en tampón TNT (Tris 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%). Se añade un anticuerpo que es capaz de unirse a péptidos Flag y que está biotinilado (BioM5, un anticuerpo anti-Flag marcado con biotina; Sigma) a la suspensión de esferas para producir una media de 10^4 moléculas de anticuerpo por esfera, y la mezcla se incuba durante varias horas. Las esferas se enjuagan mediante una centrifugación y una resuspensión en tampón TNT hasta el volumen original. Los fragmentos de ADN biotinilado N-Flag-OPD.LMB3-2biotina, o los fragmentos que portan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 y un gen que codifica una enzima diferente (que también está marcada con el péptido N-Flag), por ejemplo metiltransferasa HaeIII - N-Flag-M.HaeIII.LMB3-2biotina se añaden a la suspensión de esferas revestidas con anticuerpos a una concentración de 1,6 nM, y la mezcla se incuba durante la noche a 4 °C. Las esferas se enjuagan 3 veces mediante una centrifugación y una resuspensión en tampón TNT.

Se centrifugaron partes alícuotas de 50 μ l (aproximadamente 10^9 esferas) de la anterior suspensión de esferas en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y las esferas se resuspendieron con cuidado, en hielo, en 50 μ l de un sistema de transcripción/traducción acopladas *in vitro* procariota diseñado para moldes lineales (Lesley *et al.*, 1991). Se emplea una preparación comercial de este sistema (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (2.000 unidades). Las reacciones se incuban a 25 °C durante 1,5 horas y se centrifugan en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min. El sobrenadante se retira y las esferas se resuspenden en 100 μ l de Tris 50 mM, 10 mM de carbonato de potasio, pH 8,0. Se añade una disolución acuosa de cloruro de cobalto a una concentración de 1 mM, y las reacciones se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Las esferas se enjuagan 4 veces mediante una centrifugación y una resuspensión en tampón TNT. Por último, las esferas se resuspenden en tampón TNT hasta el volumen original.

Se añaden partes alícuotas de las anteriores esferas a disoluciones de paraoxón 0,25 mM en Tris 50 mM, pH 8,3. Las esferas se incuban a 25 °C con una agitación ocasional durante diferentes periodos de tiempo. Las esferas se centrifugan en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min, el sobrenadante se retira y su densidad óptica se mide a 405 nm. Se observa un cambio significativo en la densidad óptica a 405 nm en las esferas a las que están unidos los fragmentos de ADN biotinilado N-Flag-OPD.LMB3-2biotina (y que se hacen reaccionar después como se describió anteriormente), en contraste con las reacciones realizadas bajo las mismas condiciones pero en ausencia de esferas o fosfotriesterasa, o con esferas a las que están unidos los fragmentos de ADN N-Flag-M.HaeIII.LMB3-2biotina y que posteriormente se hacen reaccionar como se describió anteriormente.

Después, se centrifugaron 10 μ l (aproximadamente 2×10^8 esferas) de las anteriores esferas en una microcentrífuga a 10.000 g durante 3 min y se retiró el sobrenadante. Las esferas se resuspendieron en 10 μ l de EtNP-Bz-Glu-biotina confinada 12,5 o 25 μ M en Tris 50 mM, pH 8,3. Las suspensiones de esferas se incuban durante 1,5 horas a 25 °C en la oscuridad. La reacción se detiene mediante la adición de 10 μ l de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0, y se trasladan a hielo y se irradian durante 2 min con una bombila de UV B 100 AP (UVP) mantenida a una distancia de aproximadamente 6 cm. Todas las muestras de esferas entonces se incuban durante 30 min a temperatura ambiente y después se lavan tres veces con 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% en un filtro de placas MultiScreen-HV de 0,45 μ m (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado. Las esferas (aproximadamente 7×10^7) después se resuspendieron en 125 μ l de suero anti-EtBG de conejo diluido 1:125 en COVAp y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las esferas se lavaron una vez con 200 μ l de COVAp y después 3 veces con 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% como se indicó anteriormente, y se resuspendieron en 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1%. Se añadieron 70 μ l de las anteriores suspensiones de esferas (aproximadamente 2×10^7) a 50 μ l de Fab anti-conejo de cabra marcado con FITC 40 ng/ μ l (Jackson 115-095-006) en PBS, Tween 20 al 0,1%, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las esferas se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS, Tween 20 al 0,1% como se indicó anteriormente, y después se resuspendieron en 1 ml de PBS, Tween 20 al 0,1%, y se analizaron 10.000 acontecimientos empleando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

Por consiguiente, como se observa en la figura 16, las esferas a las que se unieron los genes que codifican la fosfotriesterasa marcados con el péptido Flag (junto con un anticuerpo que se une al péptido Flag) pueden distinguirse claramente de las esferas a las que se unieron otros genes que codifican enzimas sin actividad fosfotriesterasa (por ejemplo, N-Flag-M.HaeIII).

Ejemplo 11.

La BirA de *E. coli* transcrita y traducida *in vitro* cataliza una reacción que produce un cambio en las propiedades de fluorescencia de microesferas marcadas con sustrato en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite.

El gen que codifica un péptido de *Propionibacterium shermanii* que se biotinila *in vivo* en *E. coli* se amplifica utilizando los oligonucleótidos BCCP5 y BCCP3 a partir del vector Pinpoint Xa-1 (Promega). El fragmento de PCR se clona en el vector pET-23d(FLAG) digerido con *Bam*HI y *Hind*III, cadena debajo de un promotor de la ARN polimerasa de T7 y el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, y dentro de marco con una región codificadora del péptido FLAG N-terminal; este vector se denomina pET-23d(FLAG-BCCP). El vector pET-23d(FLAG) es idéntico al vector pET-23d (Novagen) excepto por la región entre los sitios exclusivos *Nco*I y *Bam*HI, que se ha modificado para incluir una región codificadora del péptido FLAG N-terminal, tal como se muestra a continuación en el esquema 2. Para añadir un marcador de hexahistidina al C-terminal de la proteína, se reasociaron los dos oligonucleótidos BCCPHis+ y BCCPHis- y después se acoplaron al vector pET-23d(FLAG-BCCP) digerido con *Sac*I y *Not*I, produciendo el vector pET-23d(FLAG-BCCP-His). La proteína FLAG-BCCP-His (denominada FBH) se sobreexpresa en la cepa C41(DE3) (Miroux y Walker, 1996), se recolecta y se purifica con Ni-NTA agarosa (Qiagen) bajo condiciones nativas, siguiendo el protocolo del fabricante. La proteína biotinilada se mema mediante una incubación con un volumen igual de avidina-agarosa (Sigma), preequilibrada con un tampón de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) durante 1 hora a 4 °C. La suspensión después se centrifuga a 10.000 g durante 2 minutos y se recupera el sobrenadante, se divide en partes alícuotas y se conserva en nitrógeno líquido (a largo plazo) o a 4 °C.

Esquema 2

M D Y K D D D D K M H G N E G

-----TATACCATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATGCATGGCAACGAAGGT

pET-23d - sitio *NcoI* (región codificadora de FLAG añadida)

T

ACCGGATCC-----AAGCTT

sitio *BamHI* de pET-23d sitio *HindIII*

El gen que codifica la BirA de *E. coli* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos BirA5 y BirA3 procedentes de un vector pBluescript 2SK+ que contiene el gen BirA de *E. coli* (un obsequio de P. Wang, no publicado). El fragmento de PCR se clona en el vector pGEM-4Z(K2) digerido con *KpnI* y *XhoI* cadena abajo del promotor *lac*, el promotor de la ARN polimerasa de T7 y el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 eficaz. El vector pGEM-4Z(K2) es idéntico al vector pGEM-4Z^{NcoI} (véase el ejemplo 8, esquema 1), excepto por la región entre los sitios exclusivos *NcoI* y *KpnI*, que se ha modificado según el esquema 3 que aparece a continuación para que contenga un sitio *XhoI* exclusivo cadena abajo del sitio *NcoI*.

Esquema 3

M G G S S

-----CCATGGGGGGCTCGAGC-----GGTACC---

pGEM-4Z^{NcoI} --- *NcoI* *XhoI* sitio *KpnI* de pGEM-4Z^{NcoI}

- 10 La secuenciación del ADN identifica un clon con la secuencia de nucleótidos correcta, denominado pGEM-BirA. El plásmido pGEM-BirA descrito se amplifica mediante PCR utilizando los cebadores LMB2 y LMB3 como se indicó anteriormente para crear un fragmento de PCR de 1139 pares de bases (BirA_LMB2-3) que porta el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, y el gen BirA. El fragmento de PCR se purifica directamente utilizando Wizard PCR Preps (Promega).
- 15 Se centrifugaron partes alícuotas de 60 µl (1,2 x 10⁹ esferas) de microesferas marcadas con anti-IgG de ratón de cabra no fluorescentes con un diámetro de 1,0 µm (Bangs Laboratories, CP03N) en una microcentrífuga a aproximadamente 2.600 g (6.000 rpm) durante 3 min. El sobrenadante se retiró y las esferas se resuspendieron en 60 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, BSA al 0,5%. Las esferas se volvieron a centrifugar, se resuspendieron en 60 µl de anticuerpo anti-FLAG M5 (Sigma F4042) y se incubaron durante la noche
- 20 a 4 °C. Las esferas se volvieron a centrifugar (2.600 g) durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y las esferas se resuspendieron en una mezcla de 30 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, BSA al 0,5% y 30 µl de proteína FBH obtenida como se indicó anteriormente (concentración final de proteína de aproximadamente 4 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 25 Entretanto, se prepararon partes alícuotas de 60 µl de un sistema de transcripción/traducción acopladas *in vitro* procariota diseñado para moldes lineales (Lesley *et al.*, 1991), utilizando un kit comercial (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (2.000 unidades), ADN BirA_LMB2-3 10 nM (o sin ADN). Estas partes alícuotas se incubaron a 25 °C durante 1 hora para permitir la traducción.
- 30 Las partes alícuotas de 60 µl de esferas se centrifugaron a 2.600 g (6.000 rpm) en una microcentrífuga durante 3 minutos y el sobrenadante se retiró. Se resuspendieron en 60 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, BSA al 0,5%, se volvieron a centrifugar y el sobrenadante se retiró. Por último, se resuspendieron en hielo en una parte alícuota de 54 µl de las reacciones de transcripción/traducción acopladas *in vitro* procariotas descritas anteriormente, suplementado con 3 µl de d-biotina 2 mM y 3 µl de ATP 0,2 M.
- Se retiró una parte alícuota de 5 µl de cada mezcla de reacción y se dejó sin emulsionar. Se emulsionaron 50 µl del resto de la mezcla de reacción fundamentalmente como en Tawfik y Griffiths (1998).
- 35 La fase oleosa se preparó en el acto disolviendo Span 80 al 4,5% (en v/v) (Fluka) en aceite mineral (Sigma, n° M-5904), seguido de Tween 80 al 0,5% (en v/v) (SigmaUltra, n° P-8074). Las mezclas de reacción enfriadas en hielo se

añadieron gradualmente (en 5 partes alícuotas de 10 µl a lo largo de aproximadamente 2 minutos) a 1,0 ml de la fase oleosa enfriada en hielo en un vial Biofreeze de 5 ml (Costar, nº 2051) mientras se agitaba con una barra magnética (8 x 3 mm con un anillo pivotal; Scientific Industries International, Loughborough, Reino Unido). La agitación (a 1150 rpm) continuó durante 1 minuto más en hielo.

- 5 Todas las reacciones se incubaron durante 4 horas a 37 °C para permitir que se desarrollase la reacción de biotinylation.

10 Las emulsiones se trasladaron a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, se centrifugaron durante 1 min, 13,5k rpm en una microcentrifuga, y la fase oleosa se retiró dejando la emulsión concentrada (pero aún intacta) en el fondo del tubo. Se añadieron 200 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, BSA al 0,5%, y la emulsión se rompió extrayendo 4 veces con 1 ml de hexano, agitando en vórtice entre cada adición de hexano. El hexano residual se retiró centrifugando durante 10 min a temperatura ambiente al vacío en un Speedvac (Farmingdale, NY).

15 Entonces aproximadamente 1×10^8 esferas procedentes de las emulsiones rotas y de las reacciones no emulsionadas se lavaron dos veces con 100 µl de TNT/BSA en una placa de filtro MultiScreen-HV de 0,45 µm (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado. Las esferas después se resuspendieron en 50 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, BSA al 0,5%, que contenía 1 µl de una disolución de estreptavidina-HRP (proporcionada con el kit NEN TSA™-Direct) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las esferas se lavaron dos veces con 100 µl de Tris 0,2 M, imidazol 10 mM, pH 8,8 como antes, y después se resuspendieron en 50 µl de Tris 0,2 M, imidazol 10 mM, pH 8,8, H₂O₂ al 0,01%. Se añadió 1 µl de una disolución madre de tiramida-fluoresceína (preparada según las instrucciones del fabricante (kit NEN TSA™-Direct)) y se dejó que la reacción se desarrollase durante diez minutos. Las esferas se lavaron dos veces con PBS como se indicó anteriormente, y por último se resuspendieron en un total de 500 µl de PBS, se trasladaron a un tubo de poliestireno de fondo redondo de 5 ml (Falcon), y se analizaron 10.000 acontecimientos utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

25 Como puede observarse en la figura 17, en las reacciones emulsionadas y no emulsionadas, la reacción catalizada por la BirA traducida *in vitro* produce esferas con una mayor fluorescencia que cuando no está presente la enzima. Parece que las esferas que se han incubado en una emulsión con BirA traducida *in vitro* son más fluorescentes que las esferas que no han sido incubadas en emulsiones.

Ejemplo 12.

30 **Un cambio en la fluorescencia de los elementos genéticos puede utilizarse para enriquecer selectivamente en elementos genéticos que codifican péptidos con una actividad de unión. Los elementos genéticos marcados con fluorescencia se aíslan mediante clasificación con citometría de flujo.**

35 Un formato para la selección de elementos genéticos es en el que el elemento genético comprende un gen unido a una microesfera, que se traduce en una microcápsula, y el producto génico traducido se acopla de nuevo a la microesfera dentro de la microcápsula. Por tanto, la compartimentación conduce a la formación de complejos de productos génicos unidos al gen que los codifica. Estos complejos posteriormente pueden seleccionarse para la unión a un ligando mediante clasificación con citometría de flujo si la interacción de unión da como resultado un cambio en la fluorescencia de la microesfera.

40 El vector pET-23d(FLAG) codifica un péptido FLAG N-terminal condensado con la región de policonector de pET23d (Novagen). El vector pET23d se digirió con *NcoI/BamHI*, se purificó en gel y se redisolvió en agua. Se mezclaron dos oligonucleótidos fosforilados sintéticos (Vh Bio Ltd., Newcastle upon Tyne, Reino Unido), FLAG y FLAGas, a una concentración de 1 µM cada uno en agua, se calentaron durante 3 min a 94 °C, y se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente antes de añadirse al vector digerido en la mezcla de acoplamiento. La reacción de acoplamiento se empleó sin purificar para transformar *E. coli* TG -1. Los clones que contienen el inserto se identificaron mediante una digestión con *KpnI* y se verificaron mediante secuenciación (Oswel Research Producto Ltd., Southampton, Reino Unido). La región de policonector de pET-23d(FLAG) es la siguiente (la secuencia de ADN y de aminoácidos se describen como SEQ ID NO:6-7, respectivamente):

NcoI KpnI

10 20 30 40 50

CCATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATGCATGGCAACGAAGGTACC

GGTACCTGATGTTTCTACTGCTACTATTTTACGTACCGTTGCTTCCATGG

M D Y K D D D D K

< marcador de péptido FLAG >

BamHI EcoRI SacI Sali HindIII Not I XhoI

60 70 80 90

GGATCCGAATTTCGAGCTCCGTCCACAAGCTTGCGGCCGCACTCCAGCA

CCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTGAACGCCGCGTGAGCTCGT

Se preparó una construcción de expresión de FLAG-HA biotinilada a partir del vector pET-23d(FLAG) mediante PCR. La secuencia del péptido YPYDVDPYA (SEQ ID NO:38) de la hemaglutinina de la gripe se añadió al marcador FLAG en pET-23d(FLAG) utilizando el cebador FLAGHA y el cebador 5'-biotinilado pETrev.b. El producto de la amplificación tiene una longitud de 903 bases y la región codificadora de la construcción es (la secuencia de ADN y de aminoácidos se describen como SEQ ID NO:8-9, respectivamente):

10 20 30 40 50

ATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATGCATGGCAACGAAGGTACCGG

TACCTGATGTTTCTACTGCTACTATTTTACGTACCGTTGCTTCCATGGCC

M D Y K D D D D K M H G N E G T G

< marcador de péptido FLAG >

60 70 80 90 100

ATCCGGAGGAGGATATCCGTATGATGTGCCGATTATGCCGGAGGAGGATCCTAA

TAGGCCTCCTCCTATAGGCATACTACACGGCCCTAATACGCCCTCCTCCTAGGATT

S G G G Y P Y D V P D Y A G G G S

*

< marcador de péptido HA >

La construcción competidora en el proceso de selección es el gen *folA* de *E. coli* que codifica la dihidrofolato reductasa amplificado a partir de pET23a/*folA* utilizando los cebadores pETfor y pETrev.b.

Los fragmentos de la PCR se purificaron en gel utilizando el kit de extracción en gel de QIAquick (Qiagen). Se midió la concentración de ADN mediante espectrofotometría de UV. Se realizaron diluciones de construcciones de expresión preparadas mediante PCR en un ADN vehículo 0,5 mg/ml preparado a partir de ADN del fago lambda digerido con *HindIII* (40 min a 80 °C, seguido de una precipitación en etanol y una disolución en agua).

Se centrifugaron 2×10^9 esferas de poliestireno de 0,95 μm revestidas con estreptavidina en una parte alícuota de 100 μl de suspensión al 1% (Bangs Laboratories, Inc., CP01N) en una microcentrífuga a aproximadamente 2.600 g (6.000 rpm) durante 3 minutos. El sobrenadante se retiró y las esferas se resuspendieron en 100 μl de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, BSA al 0,5% (TNTB). Se añadieron 7 μl del anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado M5 2 mg/ml (Sigma) a las esferas resuspendidas y la mezcla se incubó a temperatura ambiente

durante dos horas. Tras el revestimiento con el anticuerpo, las esferas se lavaron tres veces con 200 μ l de TNTB, se resuspendieron en 100 μ l de TNTB y se dividieron en las partes alícuotas de 10 μ l 1 y 2, y en las partes alícuotas de 40 μ l 3 y 4. Se preparó una disolución madre 0,7 nM de cada una: nº 1, ADN de FLAG-HA puro; nº 2, ADN de folA puro; o nº 3 y nº 4, ADN de FLAG-HA puro diluido en un exceso en 1000 veces del ADN de folA, que se prepararon en ADN lambda digerido con *Hind*III y se aplicaron a las partes alícuotas de las esferas. Se dejó que la reacción de unión se desarrollase durante la noche a 4 °C. El número máximo de genes por esfera era de 2 en las partes alícuotas 1-3, y de 0,2 en la parte alícuota 4. Las esferas revestidas con la construcción FLAG-HA actuaron como control positivo, y las esferas revestidas con folA como control negativo.

nº	ADN	Proporción folA:FLAG-HA	Esferas	ADN (nm)	ADN (μ l)	Moléculas de ADN/esfera	S30 (μ l)	Emulsión (ml)
1	FLAG-HA	-	2×10^8	0,7	1	2	25	0,5
2	folA	-	2×10^8	0,7	1	2	25	0,5
3	folA:HA	1000:1	8×10^8	0,7	4	2	50	$2 \times 0,5$
4	folA:HA	1000:1	8×10^8	0,7	0,4	0,2	50	$2 \times 0,5$

Después de una incubación durante la noche a 4 °C, las esferas se lavaron dos veces en TNTB y se resuspendieron en mezcla de traducción *in vitro* S30 (S30 Extract System for Linear Templates; Promega) suplementado con ARN polimerasa de T7 (20 unidades/ μ l).

Las reacciones de traducción *in vitro* enfriadas en hielo se añadieron gradualmente (en 5 partes alícuotas de 10 μ l a lo largo de aproximadamente 2 minutos) a 0,5 ml de la fase oleosa enfriada en hielo (recién preparada disolviendo Span 80 al 4,5% (en v/v) (Fluka) en aceite mineral (Sigma, nº M-5904), seguido de Tween 80 al 0,5% (en v/v) (SigmaUltra, nº P-8074) en un vial Costar Biofreeze de 5 ml (nº 2051)) mientras se agitaba con una barra magnética (8 x 3 mm con un anillo pivotal; Scientific Industries International, Loughborough, Reino Unido). La agitación (a 1150 rpm) continuó durante 3 minutos más en hielo. Después las reacciones se incubaron durante 90 min a 30 °C.

Las emulsiones se trasladaron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, se centrifugaron durante 8 min, 13,5k rpm en una microcentrífuga, y la fase oleosa se retiró dejando la emulsión concentrada (pero aún intacta) en el fondo del tubo. Se añadieron 200 μ l de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05% (TNT), y la emulsión se rompió extrayendo 4 veces con 1 ml de hexano, agitando en vórtice entre cada adición de hexano. El hexano residual se retiró burbujando aire a través de la suspensión de esferas durante 1-2 min a temperatura ambiente.

Las esferas de las emulsiones rotas entonces se lavaron dos veces con 100 μ l de TNT en una placa de filtro MultiScreen-HV de 0,45 μ m (Millipore, MAHVN4510), resuspendiendo a fondo entre cada lavado. Las esferas después se resuspendieron en TNTB a 10^6 esferas/ μ l y que contenía un conjugado de alta afinidad (3F10) con peroxidasa anti-HA de rata 100 mU/ml (Boehringer Mannheim).

Las esferas se incubaron con el anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con 200 μ l de TNT antes de resuspenderse en 2 ml de Tris 0,2 M, imidazol 10 mM, pH 8,8. Las esferas suspendidas se sonicaron durante 1 min en hielo utilizando un sonicador Heat Systems con una potencia de 1, 95% de ciclo, punta de 3,4 mm. Las esferas sonicadas se resuspendieron a 10^8 esferas/ml en Tris 0,2 M, imidazol 10 mM, pH 8,8. A esta suspensión de esferas se le añadió un volumen igual de tampón de amplificación de la señal de tiramina (TSA), Tris 0,2 M, imidazol 10 mM, pH 8,8, H₂O₂ al 0,004%, fluoresceína-tiramina 5 μ g/ml.

La fluoresceína-tiramina se sintetizó como se describe en Hopman *et al.* (Anthon H.N. Hopman, Frans C.S. Ramaekers, Ernst J.M. Speel, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol 46(6), 771-777, 1998).

Se deja que la reacción se desarrolle durante cinco minutos a temperatura ambiente y se detiene mediante la adición de un 1/10 de volumen de albúmina de suero bovino al 10% en PBS (BSA, Sigma). Las esferas se sedimentaron mediante centrifugación en partes alícuotas de 2 ml de la reacción de marcaje y se lavaron 2 veces en TNTB y una vez en PBS. Por último, las esferas se resuspendieron en 2 ml de PBS y se sonicaron como se indicó anteriormente.

Las esferas revestidas con genes que codifican folA, FLAG-HA o la dilución en 1000 veces de FLAG-HA en folA se analizaron en un citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson.

En la figura 18, el histograma de baja resolución A demuestra que las esferas que portan ADN de FLAG-HA (muestra nº 1) tienen significativamente más marcaje fluorescente que el control negativo de folA (muestra nº 2). Las mezclas sembradas nº 3 y nº 4 se desarrollan fundamentalmente de una manera idéntica a la muestra de control negativo, excepto por un pequeño número de esferas muy fluorescentes (panel B). El 0,04% de las esferas en la muestra nº 3 y 0,02% de las esferas en la muestra nº 4 se incluyen en la región M1 que abarca 95% de los

acontecimientos positivos.

Las esferas de las muestras nº 3 y nº 4 que se incluyen en la región M1 se clasificaron utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia MoFlo. Se adquirieron dos conjuntos de esferas clasificadas para las muestras nº 3 y nº 4. En el conjunto uno se recogieron 500 esferas en un único tubo. En el conjunto dos se recogieron 96 esferas de modo individual en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Ambos conjuntos de esferas se sometieron a una PCR de 35 ciclos utilizando los cebadores pETrev.b y FLAGrev.1.

Los productos de la amplificación se analizaron mediante una electroforesis en gel (figura 19). El tamaño de los productos era de 903 bases para FLAG-HA y 1390 pb para folA.

El análisis electroforético en gel de los productos de la reacción de amplificación sugiere un enriquecimiento significativo durante el desarrollo de la clasificación. En el panel A no hay bandas de FLAG-HA visibles en los carriles de los productos amplificados a partir de las reacciones no clasificadas nº 3 y nº 4, mientras que la banda de FLAG-HA en las muestras de las esferas clasificadas es muy visible. Los datos definitivos con respecto a la naturaleza del ADN amplificado se obtuvieron a partir del análisis del ADN amplificado de esferas individuales. En total 22 esferas de las 96 produjeron un producto de ADN para la reacción nº 3, y 50% de estos eran FLAG-HA. Para la reacción nº 4, 9 esferas produjeron productos, y 8 eran FLAG-HA.

Los datos de esferas individuales de la reacción nº 3 sugieren que, a la concentración aplicada, nominalmente 2 moléculas de ADN/esfera, la mayoría de las esferas de hecho sólo tienen un gen unido, lo cual permite un enlace inequívoco entre el gen y su producto. Sin embargo, el número relativamente elevado de esferas marcadas de modo positivo significa que aproximadamente 50% de las esferas recuperadas eran falsos positivos. En la muestra nº 4, en la que sólo había aproximadamente 0,1 genes/esfera, la pureza del ADN recuperado se aproximó al 90%, lo cual indica un enriquecimiento en casi 1000 veces en una etapa.

Oligonucleótidos

SEQ

ID NO:

11	EDHFR-Fo	5'-CGA GCT AGA GGT ACC TTA TTA CCG CCG CTC CAG AAT CTC AAA GCA ATA G-3'
12	EDHFR-Ba	5'-GCA TCT GAC AAG CTT AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GA GGA GAT ATA CAT ATG ATC AGT CTG ATT GCG GCG TTA GCG GTA G-3'
13	LMB2-Biotin	5'-Biotin-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
14	folA-FW	5'-GCG CGA AGC TTC GAT CAG TCT GAT TGC GGC G-3'
15	folA-BW	5'-GCG CCT CGA GTT CCG CCG CTC CAG AAT CTC-3'
16	pETfor.b	5'-Biotin-GAC TCC AAC GTC AAA GGG CG-3'

17	pETrev.b	5'-Biotin-GGT TTT CAC CGT CAT CAC CG-3'
18	GFP-FW	5'-GCG CGA AGC T TCG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'
19	GFP-BW	5'-GCG CCT CGA GTT TTG TAT AGT TCA TCC ATG CCA TG-3'
20	GSTM2-2Fo	5'-TGA TGC CGG TAC CTT ATT ACT TGT TGC CCC AGA CAG CC 3'
21	GSTM2-2Ba	5'-AGT TAA GTC TAA GCT TAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA TAT GCC CAT GAC ACT GGG GTA C-3'
22	LMB2	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
23	LMB3	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
24	N-Flag-OPD-Fo	5'-TCG ATA CGT CGG TAC CTT ATT ATG ACG CCC GCA AGG TCG GTG-3'
25	N-Flag-OPD-Bc	5'-CAT TGC CAA GCC ATG GAC TAC AAA GAT GAC GAT GAT AAA ATC ACC AAC AGC GGC GAT CGG ATC AAT ACC G-3'
26	BCCP5	5'-CTA GGT CAT GGA TCC ATG AAA CTG AAG GTA ACA GTC AAC GGC-3'
27	BCCP3	5'-CAG ATA GCT AAG CTT TTA TTA TTC GAT GAG CTC GAG ATC CCC-3'
28	BCCPHis+	5'-CAT CGA AGG TGG CAG CTC TGC-3'
29	BCCPHis-	5'-GGC CGC AGA GCT GCC ACC TTC GAT GAG CT-3'
30	BirA5	5'-ATC GTA GCA CTC GAG CAT GAA GGA TAA CAC CGT GCCA-3'
31	BirA3	5'-GTC ATG ACT GGT ACC TTA TTA TTT TTC TGC ACT ACG CAG-3'
32	FLAG	5'-CAT GGA CTA CAA AGA TGA CGA TGA TAA AAT GCA TGG CAA CGA AGG TAC CG-3'
33	FLAGas	5'-GAT CCG GTA CCT TCG TTG CAT GCA TTT TAT CAT CGT CAT CTT TGT AGT C-3'
34	FLAGHA	5'-AAC TCA GCT TCC TTT CGG GCT TTG TTA GGA TCC TCC TCC CGC ATA ATC CGG CAC ATC ATA CGG ATA TCC TCC TCC GGA TCC GGT ACC TTC GTT GCC-3'
35	pETrev.b	5'-biotin-GGT TTT CAC CGT CAT CAC CG-3'
36	pETfor	5'-GAC TCC AAC GTC AAA GGG CG-3'
37	FLAGrev1	5'-AAC TCA GCT TCC TTT CGG GC-3'

Referencias bibliográficas

Anderson, C.W., Straus, J.W. y Dudock, B.S. (1983), Methods Enzymol., 101, 635-644.

Anderson, J.E. (1993), Curr. Op. Struct. Biol., 3, 24-30.

5 Ash, M. y Ash, I. (1993), Handbook of industrial surfactants, Gower, Aldershot.

Atwell, S. y Wells, J.A. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9497-9502.

Baccanari, D.P., Averett, D., Briggs, C. y Burchall, J. (1977), Biochemistry, 16, 3566-3577.

Barany, F. (1991), PCR Methods Applic., 1, 5-16.

Baez, S., Segura-Aguilar, J., Widersten, M., Johansson, A.-S. y Mannervik, B. (1997), Biochem. J., 324, 25-28.

10 Bass, S., Greene, R. y Wells, J.A. (1990), Proteins, 8, 309-314.

- Becher, P. (1957), Emulsions: theory and practice, Reinhold, Nueva York,
- Benita, S., ed. (1996), Microencapsulation: methods and industrial applications, Drugs and Pharmaceutical Sciences, editado por Swarbrick, J., Nueva York, Marcel Dekker.
- Benner, S.A. (1994), Trends Biotechnol., 12, 158-163.
- 5 Berman, J., Eisenberg, S. y Tye, B.K. (1987), Methods Enzymol., 155, 528-537.
- Betlach, L., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. y Boyer, H.W. (1976), A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA, Federation Proceedings, 35, 2037-2043.
- Blattner, F.R. y Dahlberg, J.E. (1972), Nature New Biol., 237, 227-232.
- 10 Bougueleret, L., Schwarzstein, M., Tsugita, A. y Zabeau, M. (1984), Characterization of the genes coding for the Eco RV restriction and modification system of *Escherichia coli*, Nucleic Acids Res., 12(8), 3659-3676.
- Bru, R. y Walde, P. (1991), Product inhibition of alpha-chymotrypsin in reverse micelles, Eur. J. Biochem., 199(1), 95-103.
- Bru, R. y Walde, P. (1993), Catalytic activity of elastase in reverse micelles, Biochem. Mol. Biol. Int., 31(4), 685-692.
- 15 Brynes, P.J., Andrade, P. y Gordon, D. (1982), Sensitive fluorogenic substrates for the detection of trypsin-like proteases and pancreatic elastase, Anal. Biochem., 126, 447.
- Cahill, P., Foster, K. y Mahan, D.E. (1991), Clin. Chem., 37, 1482-1485.
- Chakrabarti, A.C., Breaker, R.R., Joyce, G.F. y Deamer, D.W. (1994), Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles, J. Mol. Evol., 39(6), 555-559.
- 20 Chamberlin, M. y Ring, J. (1973), J. Biol. Chem., 248, 2235-2244.
- Chang, T.M. (1987), Recycling of NAD(P) by multienzyme systems immobilized by microencapsulation in artificial cells, Methods Enzymol., 136(67), 67-82.
- Chang, T.M.S. (1992), Recent advances in artificial cells based on microencapsulation, en *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy* (Donbrow, M., ed.), pp. 323-339, CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- 25 Chapman, K.B. y Szostak, J.W. (1994), Curr. Op. Struct. Biol., 4, 618-622.
- Chetverin, A.B. y Spirin, A.S. (1995), Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 51, 225-270.
- Clackson, T. y Wells, J.A. (1994), Trends Biotechnol., 12, 173-184.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. y Falkow, S. (1996), FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), Gene (33).
- 30 Craig, D. *et al.* (1995), Fluorescence-based enzymatic assay by capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection for the determination of a few β -galactosidase molecules, Anal. Biochem., 226, 147.
- Creagh, A.L., Prausnitz, J.M. y Blanch, H.W. (1993), Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles, Enzyme Microb. Technol., 15(5), 383-392.
- Cull, M.G., Miller, J.F. y Schatz, P.J. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1865-1869.
- 35 Delagrave, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M. y Youvan D.C. (1995), Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein, Biotechnology NY, 13(2), 151-154.
- Demartis, S., Huber, A., Viti, F., Lozzi, L., Giovannoni, L., Neri, P., Winter, G. y Neri, D. (1999), J. Mol. Biol., 286, 617-633.
- 40 Dickinson, E. (1994), en Wedlock, D.J. (ed.), Emulsions and droplet size control, Butterworth-Heine-mann, Oxford, vol. pp. 191-257.
- Ehrig, T., O'Kane, D.J. y Prendergast, F.G. (1995), Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra, FEBS Lett., 367(2), 163-166.
- Ellington, A.D. y Szostak, J.W. (1990), Nature, 346, 81822.
- Ellman, J., Mendel, D., Anthony, C.S., Noren, C.J. y Schultz, P.G. (1991), Methods Enzymol., 202, 301-336.

- Fahy, E., Kwoh, D.Y. y Gingeras, T.R. (1991), PCR Methods Appl., 1, 25-33.
- Fields, S. y Song, O. (1989), A novel genetic system to detect protein-protein interactions, Nature, 340, 245-246.
- Finch, C.A. (1993), Encapsulation and controlled release, Spec. Publ.-R. Soc. Chem., 138, 35.
- 5 Fisch, I., Kontermann, R.E., Finnern, R., Hartley, O., Soler, G.A., Griffiths, A.D. y Winter, G. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7761-7766.
- Fornusek, L. y Vetvicka, V. (1986), Polymeric microspheres as diagnostic tools for cell surface marker tracing, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 2, 137-174.
- Feese, E. (1959), J. Mol. Biol., 1, 87.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. y Siede, W. (1995), DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington D.C.
- 10 Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. y Yarus, M. (1995), Annu. Rev. Biochem., 64, 763-797.
- Green, R. y Szostak, J.W. (1992), Science, 258, 1910-1915.
- Gregoriadis, G. (1976), Methods Enzymol., 44, 218-227.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J. *et al.* (1994), EMBO J., 13, 3245-3260.
- 15 Guixé, V., Rodríguez, P.H. y Babul, J. (1998), Ligand-induced conformational transitions in *Escherichia coli* phosphofructokinase 2, Biochemistry, 37, 13269-13275.
- Haber, J., Maslakiewicz, P., Rodakiewicz, N.J. y Walde, P. (1993), Activity and spectroscopic properties of bovine liver catalase in sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate/isooctane reverse micelles, Eur. J. Biochem., 217(2), 567-573.
- 20 Habig, W.H. y Jakoby, W.B. (1981), Methods in Enzymology, 77, 398-405.
- Hanes, J. y Pluckthun, A. (1997), In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4937-4942.
- Haugland, R.H. (ed.) (1996), Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ª edición, Molecular Probes, pp. 201-250.
- 25 Heim, R. y Tsien, R.Y. (1996), Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, Curr. Biol., 6(2), 178-182.
- Hermanson, G.T. (1996), Bioconjugate techniques, Academic Press, San Diego.
- Hochuli, E., Dobeli, H. y Schacher, A. (1987), J. Chromatogr., 411, 177-184.
- Hong, S.-B., y Raushel, F.M. (1999), Biochemistry, 38, 1159-1165.
- 30 Hoogenboom, H.R. (1997), Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies, Trends Biotechnol., 15, 62-70.
- Hoogenboom, H.R. *et al.* (1991), Nucl. Acids Res., 91, 4133-4137.
- Huang, Z. *et al.* (1992), A sensitive competitive ELISA for 2,4-dinitrophenol using 3,6-fluorescein diphosphate as a fluorogenic substrate, J. Immunol. Meth., 149, 261.
- 35 Janda, K.D., Lo, L.-C., Lo, C.-H.L., Sim, M., -M., Wang, R., Wong, C.-H. y Lerner, R.A. (1997), Science, 275, 945-948.
- Jestin, J.-L., Kristensen, P. y Winter, G. (1999), Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 38, 1124-1127.
- Johannsson, A. (1991), en Price, C.P. y Newman, D.J. (ed.), Heterogeneous enzyme immunoassays, Stockton Press, Nueva York, vol. pp. 295-325.
- 40 Johannsson, A. y Bates, D.L. (1988), en Kemeny, D.M. y Challacombe, S.I. (ed.), Amplification by second enzymes, John Wiley, Chichester, vol. pp. 85-106.
- Jones, L.J. *et al.* (1997), Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement, Anal. Biochem., 251, 144.

- Joyce, G.F. (1994), Curr. Op. Structural Biol., 4, 331-336.
- Kadir, F.H. y Moore, G.R. (1990), FEBS Lett., 276, 81-84.
- Kallen, R.G. y Jencks, W.P. (1966), The mechanism of the condensation of formaldehyde with tetrahydrofolic acid, J. Biol. Chem., 241, 5851-5863.
- 5 Katanaev, V.L., Kurnasov, O.V. y Spirin, A.S. (1995), FEBS Lett., 359, 89-92.
- Keij, J.F., Groenewegen, A.C. y Visser, J.W.M. (1994), High-speed photodamage cell sorting: An evaluation of the ZAPPER prototype, Methods in cell biology, 42, 371-358.
- Kerker, M. (1983), Elastic and inelastic light scattering in flow cytometry, Cytometry, 4, 1-10.
- Klug, A. (1995), Ann. NY Acad. Sci., 758, 143-160.
- 10 Klug, A. y Schwabe, J.W. (1995), FASEB T., 9, 597-604.
- Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Kommer, A. y Spirin, A.S. (1995), Biochem. Cell Biol., 73, 1217-1220.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. y Rehrauer, W.M. (1994), Microbiol. Rev., 58, 401-465.
- 15 Krumdiek, C.L. y Baugh, C.M. (1980), Solid-phase synthesis of pteroylpolyglutamates, Methods Enzymol., pp. 524-529.
- Kumar, A., Kumar, A. y Katiyar, S.S. (1989), Activity and kinetic characteristics of glutathione reductase in vitro in reverse micellar waterpool, Biochim. Biophys. Acta, 996(1-2), 1-6.
- Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. y Hood, L. (1988), Science, 241, 1077-1080.
- 20 Lesley, S.A., Brow, M.A. y Burgess, R.R. (1991), Use of in vitro protein synthesis from polymerase chain reaction-generated templates to study interaction of *Escherichia coli* transcription factors with core RNA polymerase and for epitope mapping of monoclonal antibodies, J. Biol. Chem., 266(4), 2632-2638.
- Lesley, S.A. (1985), Methods Mol. Biol., 37, 265-278.
- Leung, D.W., Chen, E. y Goeddel, D.V. (1989), Technique, 1, 11-15.
- Liao, H., McKenzie, T. y Hageman, R. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 576-580.
- 25 Lim, F. y Sun, A.M. (1980), Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas, Science, 210(4472), 908-910.
- Lim, F., ed. (1984), Biomedical applications of microencapsulation, Boca Ratón, Florida, CRC Press.
- Lissant, K.J., ed., Emulsions and emulsion technology. Surfactant, Science, Nueva York, Marcel Dekker, 1974.
- Lissant, K.J., ed., Emulsions and emulsion technology. Surfactant, Science, Nueva York, Marcel Dekker, 1984.
- 30 Lorenz, W.W., McCann, R.O., Longiaru, M. y Cormier, M.J. (1991), Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(10), 4438-4442.
- Low, N.M., Holliger, P.H. y Winter, G. (1996), J. Mol. Biol., 260, 359-368.
- Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. y Wells, J.A. (1991), Biochemistry, 30, 10832-10838.
- 35 Luisi, P.L. y B., S.-H. (1987), Activity and conformation of enzymes in reverse micellar solutions, Methods Enzymol., 136(188), 188-216.
- Ma, C., Kudlicki, W., Odom, O.W., Kramer, G. y Hardesty, B. (1993), Biochemistry, 32, 7939-7945.
- Mackenzie, N.M. y Pinder, A.C. (1986), The application of flow microfluorimetry to biomedical research and diagnosis: a review, Dev., Biol. Stand., 64, 181-193.
- Magdassi, S., Frenkel, M., Cartin, N. y Cazan, R. (1984), 97, 377-379.
- 40 Mahajan, N.P., Linder, K., Berry, G., Gordon, G.W., Heim, R. y Herman, R. (1998), Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer, Nat. Biotechnol., 16(6), 547-552.

- Manley, J.L., Fire, A., Samuels, M. y Sharp, P.A. (1983), *Methods Enzymol.*, 101, 568-582.
- Mao, Q. y Walde, P. (1991), Substrate effects on the enzymatic activity of alpha-chymotrypsin in reverse micelles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178(3), 1105-1112.
- 5 Mao, Q., Walde, P. y Luisi, P.L. (1992), Kinetic behaviour of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. A stopped-flow study, *Eur. J. Biochem.*, 208(1), 165-170.
- Masui, R. y Kuramitsu, S. (1998), Probing of DNA-binding sites of *Escherichia coli* RecA protein utilizing 1-anilinonaphtalene-8-sulfonic acid, *Biochemistry*, 37, 12133-12143.
- Matayoshi, E.D. *et al.* (1990), Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer, *Science*, 247, 954.
- 10 Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. y Dower, W.J. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9022-9026.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. y Chiswell, D.J. (1990), *Nature*, 348, 552-554.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. y Green, M.R. (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 703556.
- Mendel, D., Cornish, V.W. y Schultz, P.G. (1995), *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24, 435-462.
- 15 Menger, F.M. y Yamada, K. (1979), *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 6731-6734.
- Miele, E.A., Mills, D.R. y Kramer, F.R. (1983), *J. Mol. Biol.*, 171, 281-295.
- Miroux, B., Walker, J.E. (1996), *Journal of Molecular Biology*, 260, 289-298.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCafferty, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. y Tsien, R.Y. (1997), Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, 388(6645), 882-887.
- 20 Mize, P.D., Hoke, R.A., Linn, C.P., Reardon, J.E. y Schulte, T.H. (1989), *Anal. Biochem.*, 179, 229-235.
- Mock, D.M., Langford, G., DuBois, D., Criscimagna, N. y Horowitz, P. (1985), *Anal. Biochem.*, 151, 178-181.
- Montigiani, S., Neri, G., Neri, P. y Neri, D. (1996), *J. Mol. Biol.*, 258, 6-13.
- Moore, M.J. (1995), *Nature*, 374, 766-777.
- Mulbry, W.W. y Karns, J.S. (1989), *Journal of Bacteriology*, 171, 6740-6746.
- 25 Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y. y Yanagawa, H. (1997), In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro, *FEBS Letters*, 414, 405-408.
- New, R.R.C., ed. (1990), *Liposomes: a practical approach*. The practical approach series, editado por Rickwood, D. y Hames, B.D., Oxford: Oxford University Press.
- 30 Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. y Winter, G. (1994), *EMBO J.*, 13, 692-698.
- Norman, S.O. (1980), *Flow cytometry, Med. Phys.*, 7, 609-615.
- Oberholzer, T., Albrizio, M. y Luisi, P.L. (1995a), Polymerase chain reaction in liposomes, *Chemistry and Biology*, 2, 677-682.
- 35 Oberholzer, T., Wick, R., Luisi, P.L. y Biebricher, C.K. (1995b), Enzymatic RNA replication in self-reproducing vesicles: an approach to a minimal cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207(1), 250-257.
- Omburo, G.A., Kuo, J.M., Mullins, L.S. y Rauschel, F.M. (1992), *Journal of Biological Chemistry*, 267, 13278-13283.
- Parmley, S.F. y Smith, G.P. (1988), *Gene*, 73, 305-318.
- 40 Pederson, H., Holder, S., Sutherlin, D.P., Schwitter, U., King, D.S. y Schultz, P.G. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10523-10528.
- Pelham, H.R. y Jackson, R.J. (1976), *Eur. J. Biochem.*, 67, 247-256.
- Perelson, A.S. y Oster, G.F. (1979), *J. Theor. Biol.*, 81, 64570.

- Pérez, G.M., Sánchez, F.A. y García, C.F. (1992), Application of active-phase plot to the kinetic analysis of lipoxygenase in reverse micelles, *Biochem. J.*
- Pirrung y Huang (1996), *Bioconjugate Chemistry*, 7, 317-321.
- Posner, B.A., Li, L., Bethell, R., Tsuji, T. y Benkovic, S.J. (1996), *Biochemistry*, 35, 1653-1663.
- 5 Qi, X., Grabowski, G.A. (1998), Acid beta-glucosidase: intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C, *Biochemistry*, 37, 11544-11554.
- Roberts, B.E., Gorecki, M., Mulligan, R.C., Danna, K.J., Rozenblatt, S. y Rich, A. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1922-1926.
- Roberts, J.W. (1969), *Nature*, 224, 1168-1174.
- 10 Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997), RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-12302.
- Rolland, J.M., Dimitropoulos, K., Bishop, A., Hocking, G.R. y Nairn, R.C. (1985), Fluorescence polarization assay by flow cytometry, *J. Immunol. Methods*, 76, 1-10.
- Rosenberg, M., Weissman, S. y Decrombrugghe, B. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 4755-4764.
- 15 Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988), *Science*, 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- 20 Savage, M.D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G.W., Morgensen, S. y Conklin, E.J. (1994), *Avidin-biotin chemistry: a handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford.
- Schick, M.J. (1966), *Nonionic surfactants*, Marcel Dekker, Nueva York.
- Shapiro, H.M. (1983), Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale, *Cytometry*, 3, 227-243.
- Sherman, P. (1968), *Emulsion science*, Academic Press, Londres.
- 25 Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. y Haselhof, J. (1996), Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein, *Current Biology*, 6, 1653-1663.
- Smith, G.P. (1985), *Science*, 228, 1315-1317.
- Soumillion, P., Jaspers, L., Bouchet, M., Marchand, B.J., Winter, G. y Fastrez, J. (1994), *J. Mol. Biol.*, 237, 415-422.
- Stemmer, W.P. (1994a), *Nature*, 370, 389-391.
- 30 Stemmer, W.P. (1994b), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10747-10751.
- Stofko, H.R., Carr, D.W. y Scott, J.D. (1992), *FEBS Lett.*, 302, 247-248.
- Sun, A.M., Vasek, I. y Tai, I. (1992), Microencapsulation of living cells and tissues, en *Microencapsulation and nanoparticles in medicine and pharmacy* (Donbrow, M., ed.), pp. 315-322, CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Sundberg et al. (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12050-12057.
- 35 Tawfik, D.S., Green, B.S., Chap, R., Sela, M. y Eshhar, Z. (1993), catELISA: a facile general route to catalytic antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2), 373-377.
- Tawfik, D.S., Lindner, A.B., Chap, R., Kim, S.-H., Green, B.S. y Eshhar, Z. (1997), en *Immunology Methods Manual*, pp. 553-559, ed. I. Lefkovits, Academic Press, Londres.
- 40 Tawfik, D.S. y Griffiths, A.D. (1998), Man-made cell-like compartments for molecular evolution, *Nature Biotechnology*, 16, 652-656.
- Tokatlidis, K., Friguet, B., Deville, B.D., Baleux, F., Fedorov, A.N., Navon, A., Djavadi, O.L. y Goldberg, M.E. (1995), *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 348, 89-95.
- Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T. y Hodges, R.S. (1996), *Protein Engng.*, 9, 1029-1042.

- Tuerk, C. y Gold, L. (1990), *Science*, 249, 505-510.
- van Hal, D.A., Bouwstra, J.A. y Junginger, H.E. (1996), Nonionic surfactant vesicles containing estradiol for topical application, en *Microencapsulation: methods and industrial applications* (Benita, S., ed.), pp. 329-347, Marcel Dekker, Nueva York.
- 5 Voss, E.W. (1993), Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry, *J. Mol. Recognit.*, 6, 51-58.
- Walde, P., Goto, A., Monnard, P.-A., Wessicken, M. y Luisi, P.L. (1994), Oparin's reactions revisited: enzymatic synthesis of poly(adenylic acid) in micelles and self-reproducing vesicles, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 7541-7547.
- 10 Walde, P., Han, D. y Luisi, P.L. (1993), Spectroscopic and kinetic studies of lipases solubilized in reverse micelles, *Biochemistry*, 32(15), 4029-4034.
- Walde, P., Peng, Q., Fadnavis, N.W., Battistel, E. y Luisi, P.L. (1988), Structure and activity of trypsin in reverse micelles, *Eur. J. Biochem.*, 173(2), 401-409.
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. y Malinowski, D.P. (1992), *Nucleic Acids Res.*, 20, 1691-1696.
- 15 Wang, G.T. *et al.* (1990), Design and synthesis of new fluorogenic HIV protease substrates based on resonance energy transfer, *Tetrahedron Lett.*, 31, 6493.
- Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. y Roeder, R.G. (1979), *Cell*, 18, 469-484.
- Whateley, T.L. (1996), Microcapsules: preparation by interfacial polymerisation and interfacial complexation and their applications, en *Microencapsulation: methods and industrial applications* (Benita, S., ed.), pp. 349-375, Marcel Dekker, Nueva York.
- 20 Wick, R. y Luisi, P.L. (1996), Enzyme-containing liposomes can endogenously produce membrane-constituting lipids, *Chem. Biol.*, 3(4), 277-285.
- Widersten, M. y Mannervik, B. (1995), *J. Mol. Biol.*, 250, 115-122.
- Williams, J.W., Morrison, J.F. y Duggleby, R.G. (1979), *Biochemistry*, 18, 2567-2573.
- 25 Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R. (1994), *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 433-455.
- Wyatt, J.R.I., Chastain, M. y Puglisi, J.D. (1991), *Biotechniques*, 11, 764-769.
- Yamagishi, J., Kawashima, H., Matsuo, N., Ohue, M., Yamayoshi, M., Fukui, T., Kotani, H., Furata, R., Nakano, K. y Yamada, M. (1990), *Protein Eng.*, 3, 713-719.
- 30 Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., González, F.A., Pannell, R., Neuberger, M.S. y Milstein, C. (1995), *Nature*, 376, 225-229.
- Zaccolo, M., Williams, D.M., Brown, D.M. y Gherardi, E. (1996), *J. Mol. Biol.*, 255, 589-603.
- Zakrzewski, S.F. (1980), Preparation of tritiated dihydrofolic acid of high specific activity, *Methods Enzymol.*, pp. 539.
- Zaug, A.J. y Cech, T.R. (1986), *Biochemistry*, 25, 4478-4482.
- Zaug, A.J. y Cech, T.R. (1986), *Science*, 231, 470-475.
- 35 Zaug, A.J., Been, M.D. y Cech, T.R. (1986), *Nature*, 324, 429-433.
- Zubay, G. (1973), *Annu. Rev. Genet.*, 7, 267-287.
- Zubay, G. (1980), *Methods Enzymol.*, 65, 856-877.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para aumentar la concentración de una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de:
 - (a) formar microcápsulas acuosas en una emulsión de agua en aceite, en el que una pluralidad de microcápsulas incluyen una molécula de ácido nucleico, una esfera que es capaz de unirse a la molécula de ácido nucleico, y una disolución acuosa que comprende los componentes necesarios para realizar la amplificación del ácido nucleico;
 - (b) amplificar la molécula de ácido nucleico en la microcápsula para formar copias del producto amplificado de la molécula de ácido nucleico; y
 - (c) capturar las copias del producto amplificado en la esfera dentro de las microcápsulas;aumentando con ello la concentración de la molécula de ácido nucleico.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha amplificación del ácido nucleico se realiza utilizando una amplificación de Q β replicasa, una reacción en cadena de la ligasa, una replicación de secuencias autosostenido o una amplificación por desplazamiento de hebra.
- 3.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha amplificación del ácido nucleico se realiza utilizando una reacción en cadena de la polimerasa.
- 4.- Un método según la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la emulsión de agua en aceite incluye al menos un estabilizante de la emulsión.
- 5.- Un método según la reivindicación 4, en el que dicho estabilizante de la emulsión es un tensioactivo no iónico.
- 6.- Un método según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el estabilizante de la emulsión se selecciona de monooleato de sorbitán y monooleato de polioxietilensorbitán.
- 7.- Un método según la reivindicación 4, en el que dicho estabilizante de la emulsión es un tensioactivo aniónico.
- 8.- Un método según la reivindicación 4 o la reivindicación 8, en el que el estabilizante de la emulsión se selecciona de colato de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio y desoxicolato de sodio.
- 9.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la emulsión es termoestable.
- 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un marcador de biotina.
- 11.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha esfera comprende un revestimiento de avidina o estreptavidina.
- 12.- Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 11, en el que dicha esfera se selecciona de esferas de poliestireno, paramagnéticas y magnéticas.
- 13.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte en fase sólida es una esfera, la amplificación del ácido nucleico se realiza utilizando una reacción en cadena de la polimerasa, y la emulsión es termoestable.
- 14.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula de ácido nucleico es ADN genómico o ADNc.
- 15.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una pluralidad de microcápsulas, cuando se forman, contienen, cada una, una media de una o menos de una molécula de ácido nucleico.
- 16.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que una pluralidad de microcápsulas, cuando se forman, contienen, cada una, una media de entre 5 y 1000 moléculas de ácidos nucleicos.
- 17.- Un método para producir un producto génico a partir de uno o más elementos genéticos que comprenden ácidos nucleicos, comprendiendo dicho método:
 - (a) proporcionar esferas y uno o más elementos genéticos que comprenden ácidos nucleicos, en el que dichas esferas están adaptadas para acoplarse a dicho uno o más elementos genéticos y al producto génico producido a partir de dichos elementos genéticos, y dicho uno o más elementos genéticos están adaptados para acoplarse a dichas esferas, y combinar dichas esferas y elementos genéticos de modo que dichos elementos genéticos se unen a dichas esferas;
 - (b) compartimentar dicho uno o más elementos genéticos unidos a las esferas dentro de las microcápsulas acuosas con los componentes necesarios para producir un producto génico a partir de dicho uno o más elementos genéticos,

estando dichas microcápsulas formadas a partir de una emulsión de agua en aceite;

(c) expresar dicho uno o más elementos genéticos dentro de dichas microcápsulas para producir los respectivos productos génicos, de modo que dichos productos génicos se acoplan de nuevo a dichas esferas;

5 en el que dicha etapa de expresión comprende la transcripción, la traducción inversa, la replicación o la traducción, y dicho producto génico se selecciona de ADN, ARN o una proteína, o un ácido nucleico o una proteína que contiene bases o aminoácidos no naturales.

18.- Un método según la reivindicación 17, en el que dichas esferas comprenden esferas de poliestireno, no magnéticas, magnéticas, o paramagnéticas.

10 19.- Un método según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que dicho uno o más elementos genéticos comprenden un banco de elementos genéticos que está compartimentado dentro de dichas microcápsulas.

20.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en el que dichas esferas están revestidas con una sustancia para la unión de elementos genéticos con una afinidad muy alta, por ejemplo, avidina o estreptavidina.

21.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 17-20, que comprende aumentar la concentración de dicho ácido nucleico dentro de dichas microcápsulas mediante amplificación.

15 22.- Un método según la reivindicación 21, en el que dicha amplificación comprende una transcripción utilizando ARN polimerasas, la reacción en cadena de la polimerasa, una amplificación de Qb replicasa, la reacción en cadena de la ligasa, o una sistema de replicación de secuencias autosostenido y una amplificación por desplazamiento de hebra.

20 23.- Un método según la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en el que dicha emulsión es termoestable, y dicha amplificación comprende un termociclado.

24.- Un método según la reivindicación 20, en el que dicho ácido nucleico está biotinilado para su acoplamiento a dichas esferas.

25.- Un método según la reivindicación 24, en el que dicho ácido nucleico se biotinila para la amplificación por PCR con un cebador de 5'-biotinilación.

25

FIGURA 1

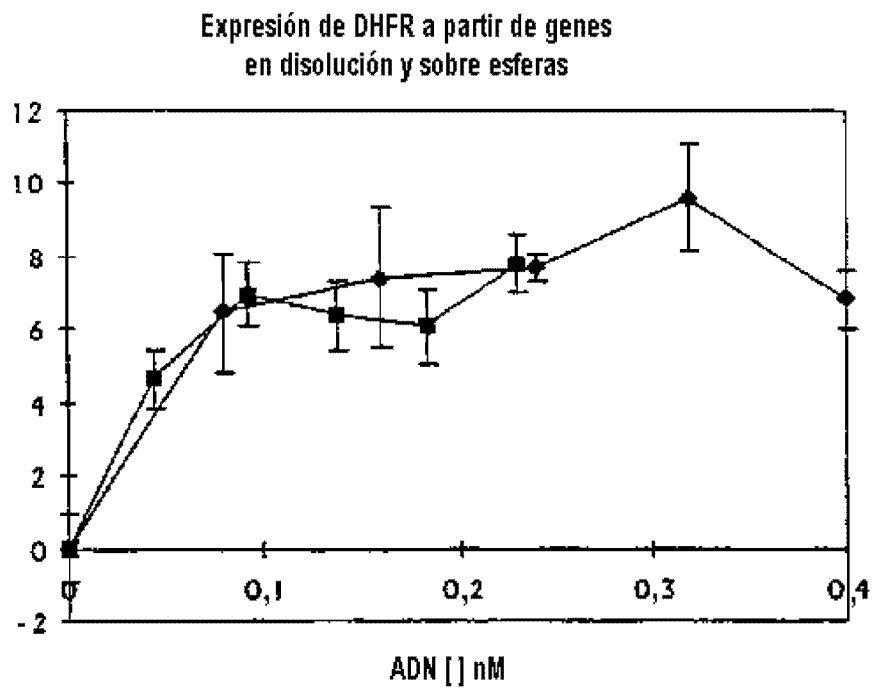


FIGURA 2

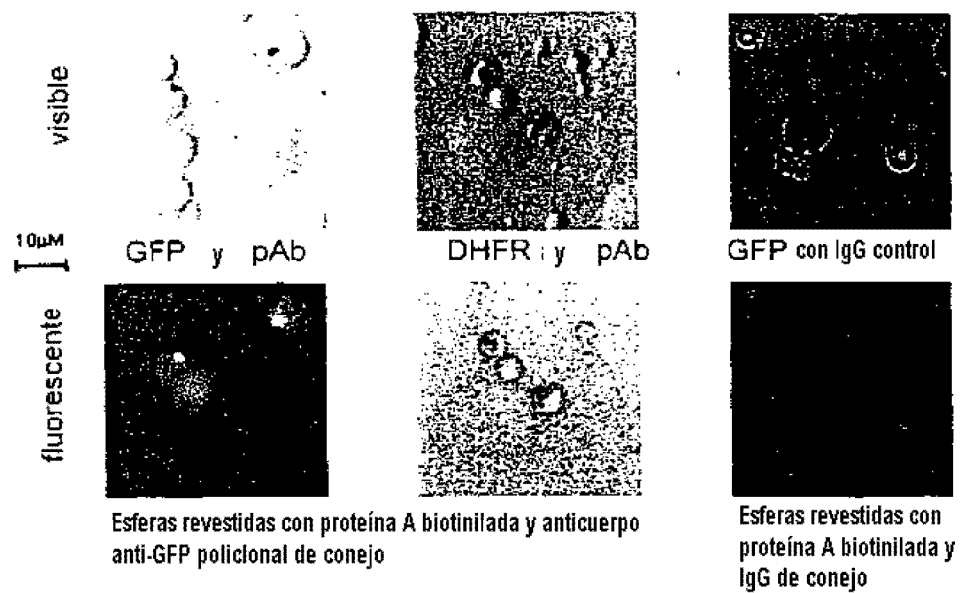


FIGURA 3

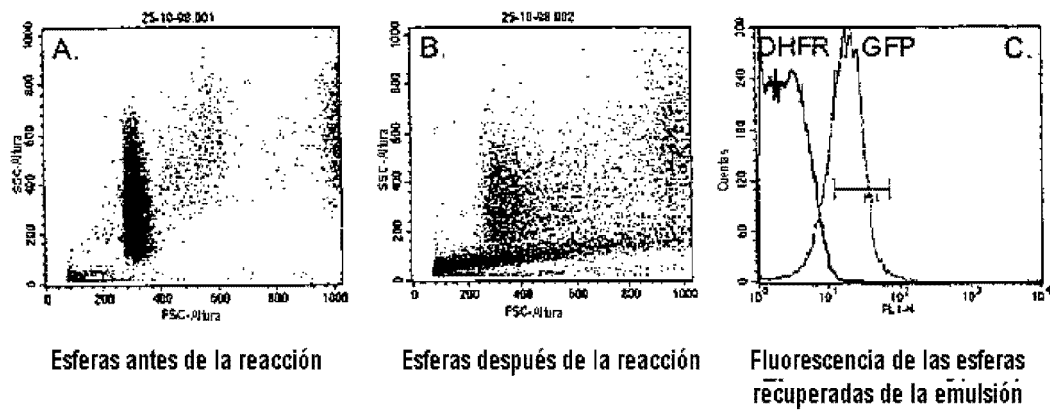


FIGURA 4

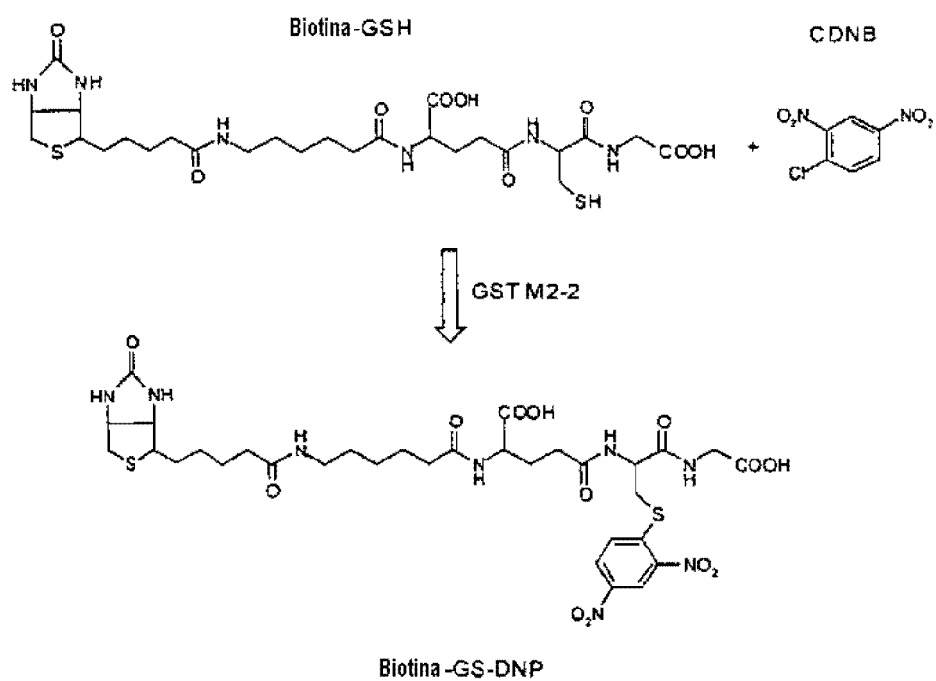


FIGURA 5

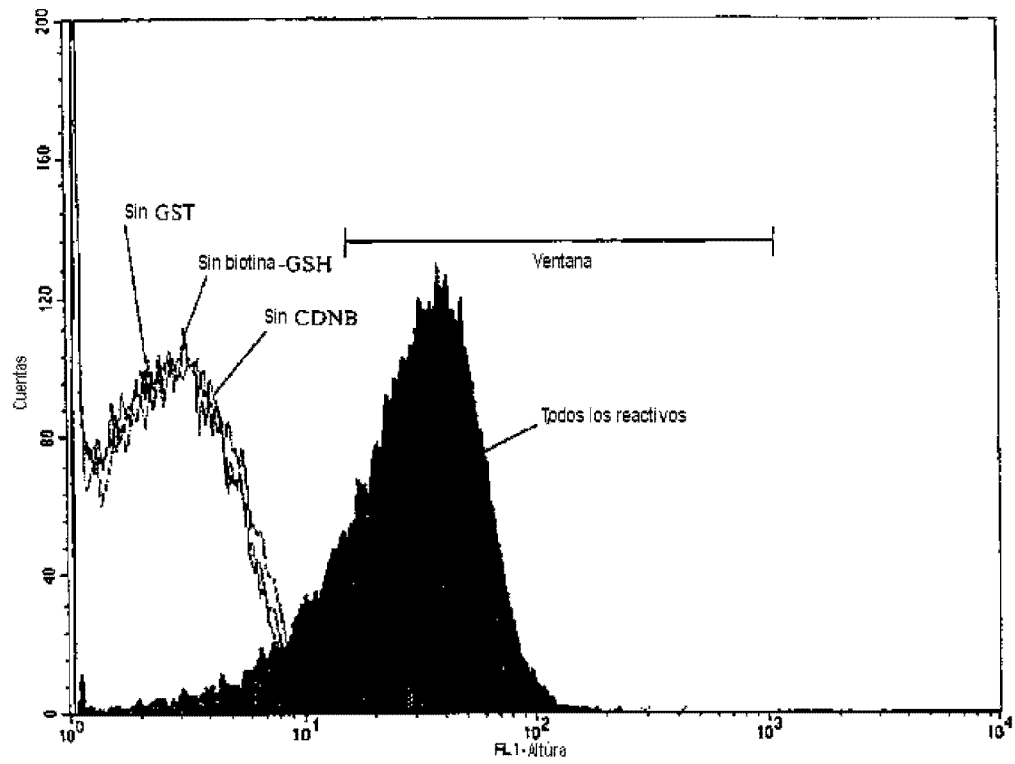


FIGURA 6

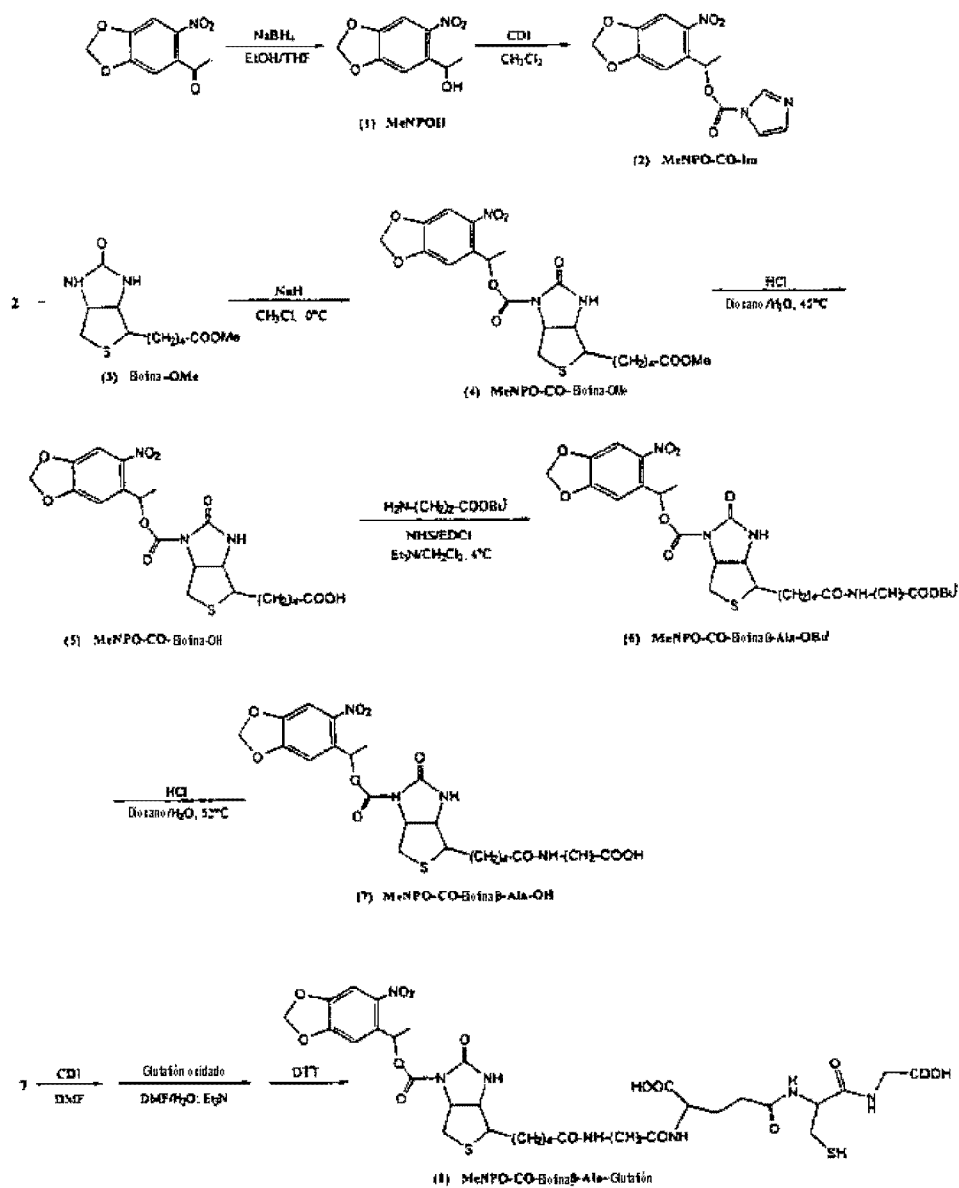


FIGURA 7

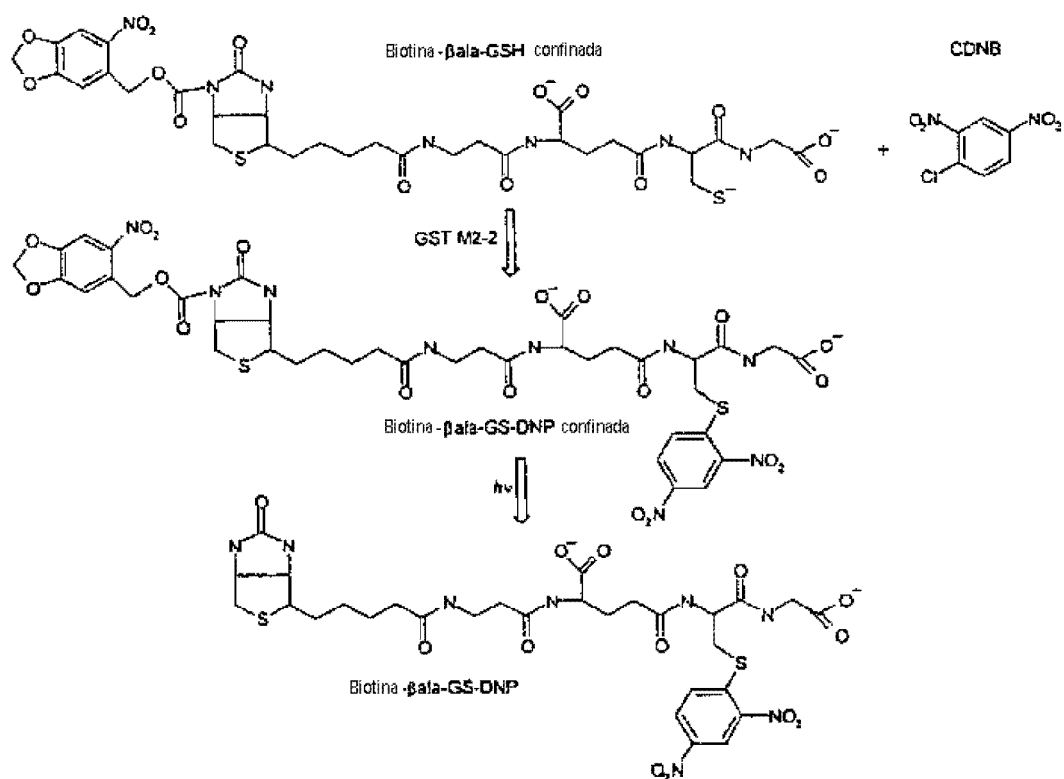


FIGURA 8

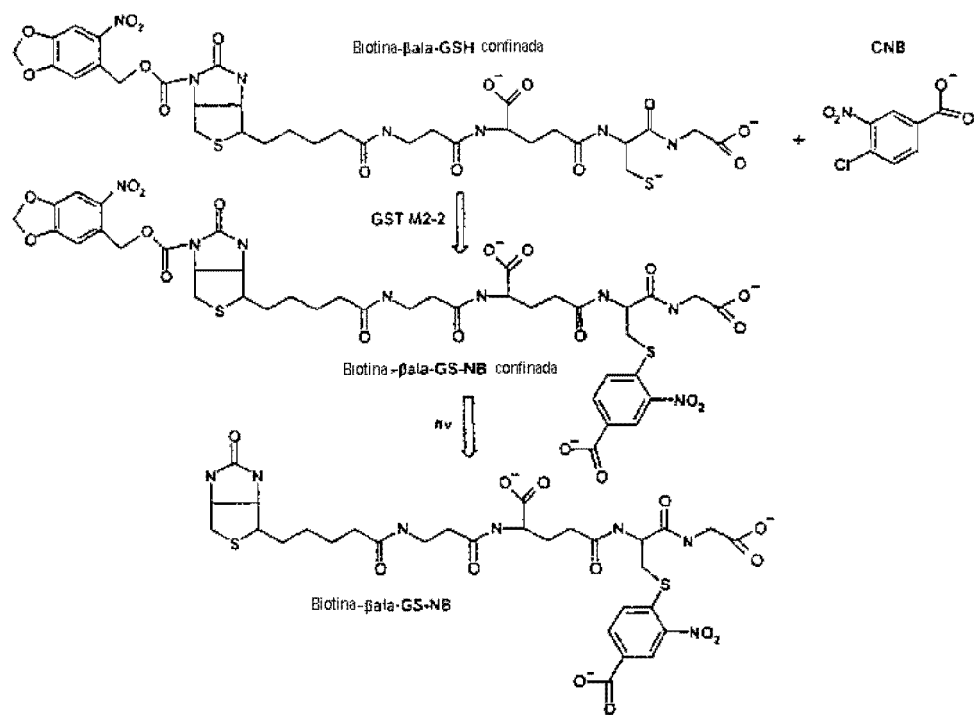


FIGURA 9

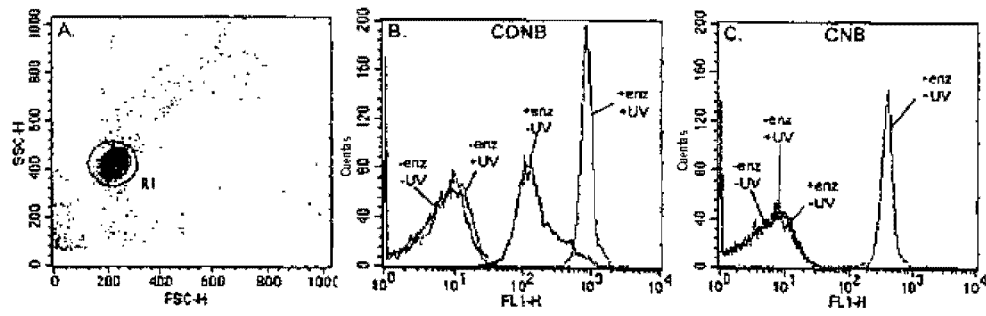


FIGURA 10

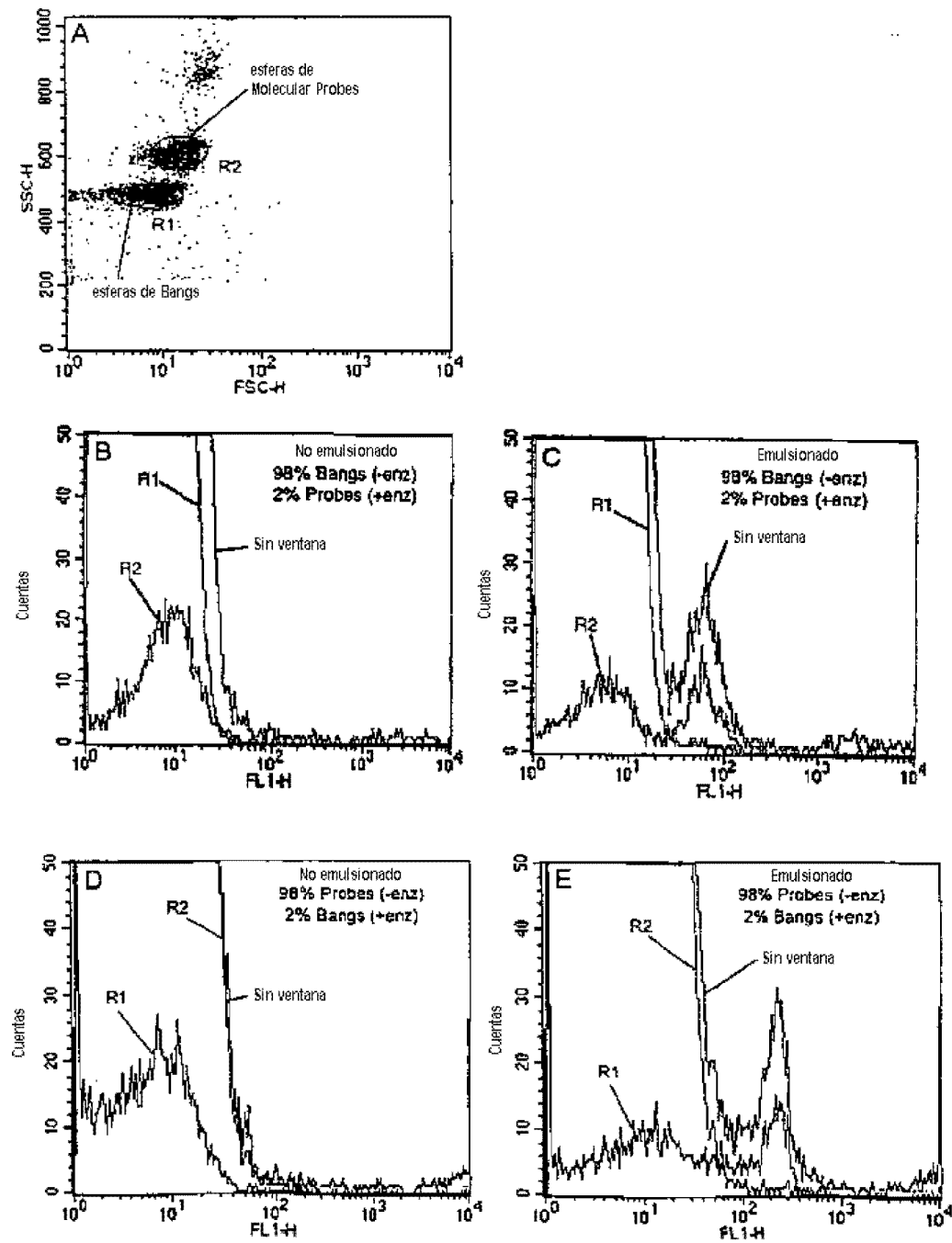


FIGURA 11

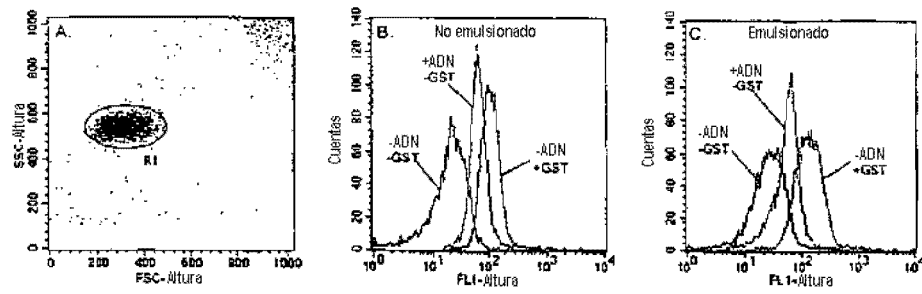


FIGURA 13

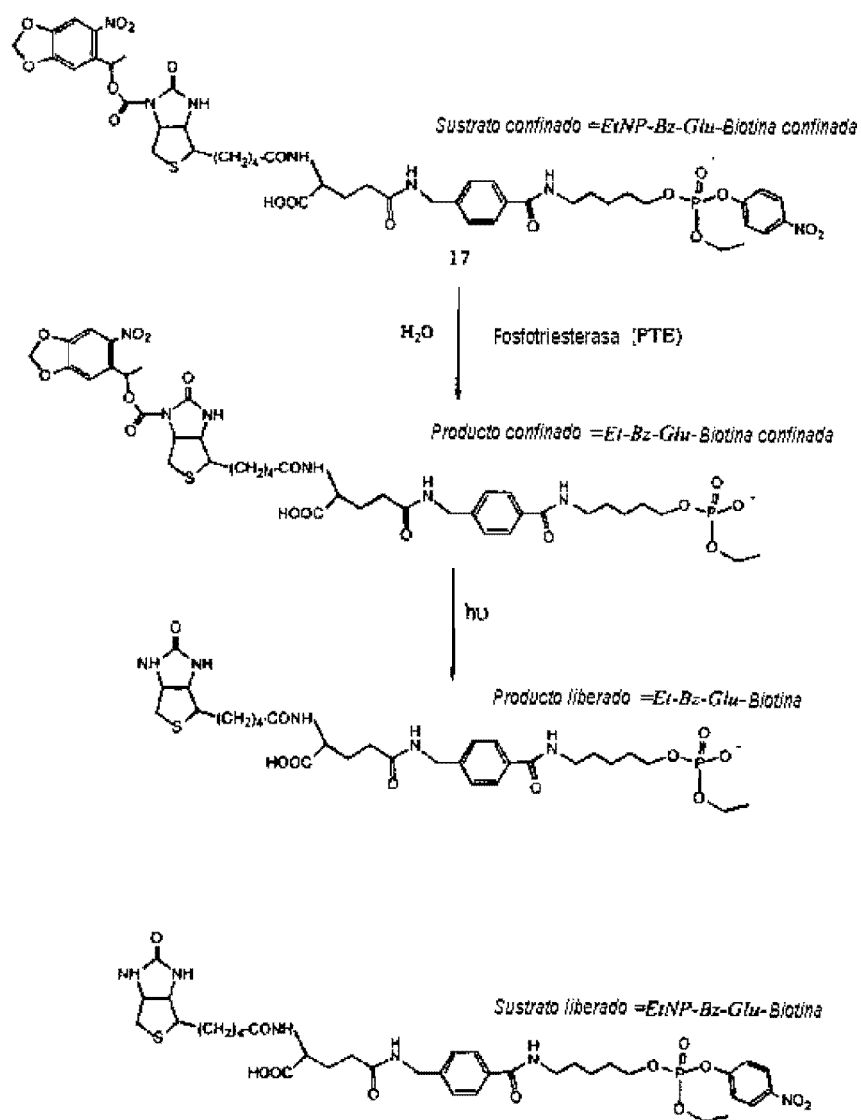


FIGURA 14

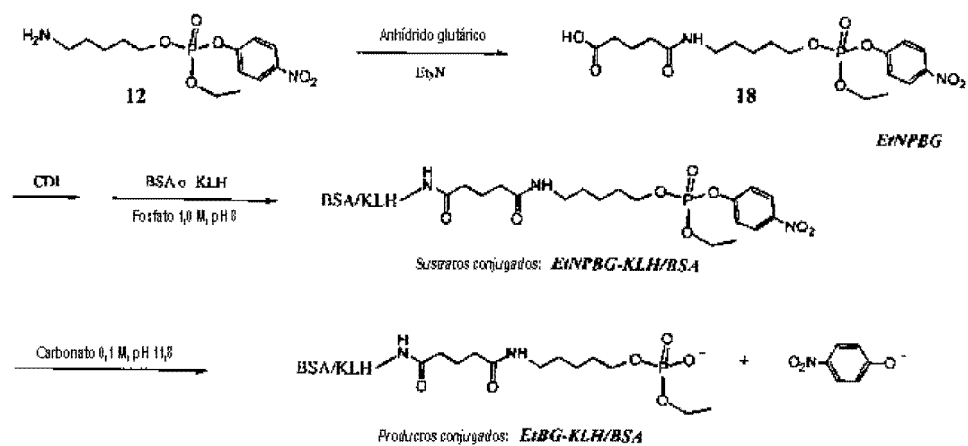


FIGURA 15

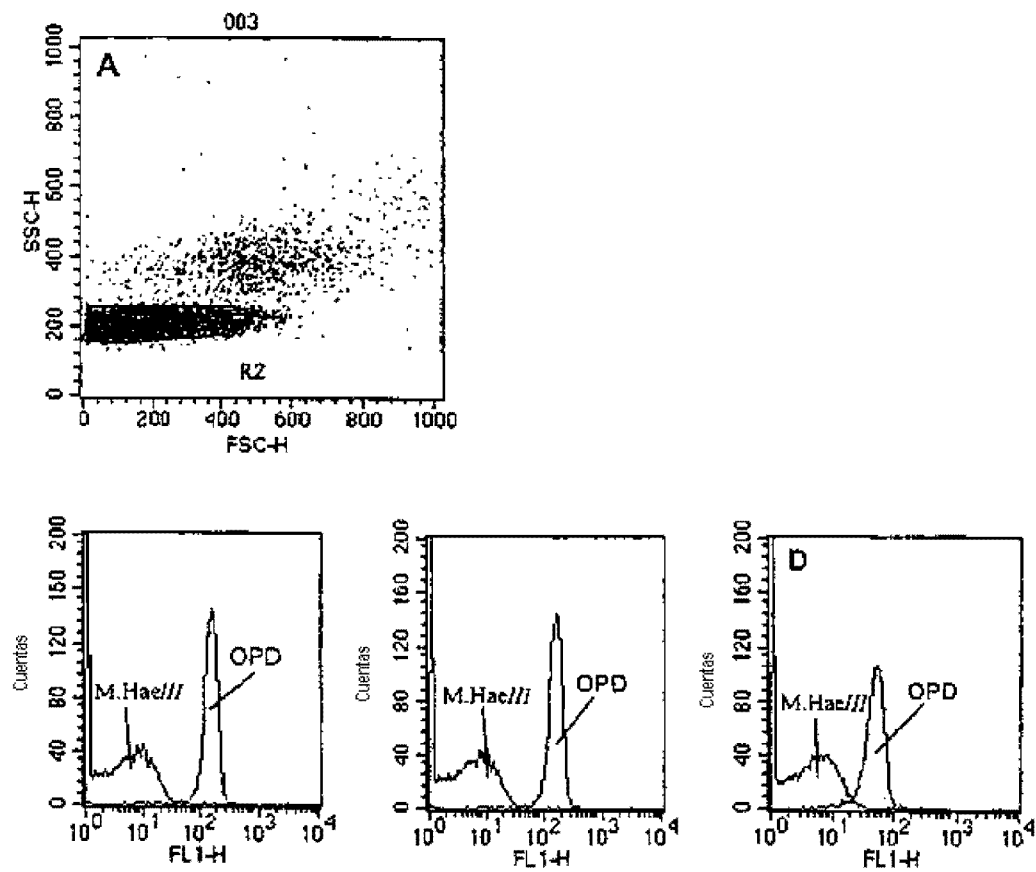


FIGURA 16

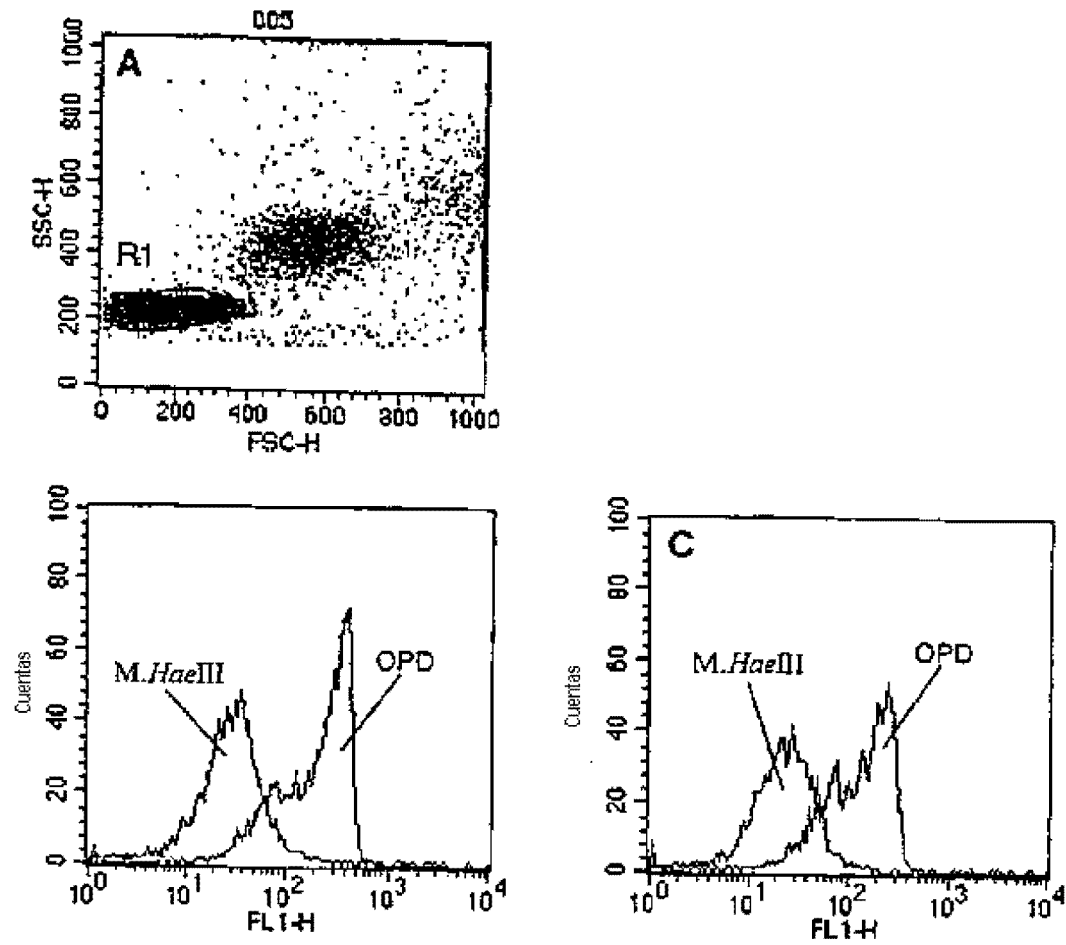


FIGURA 17

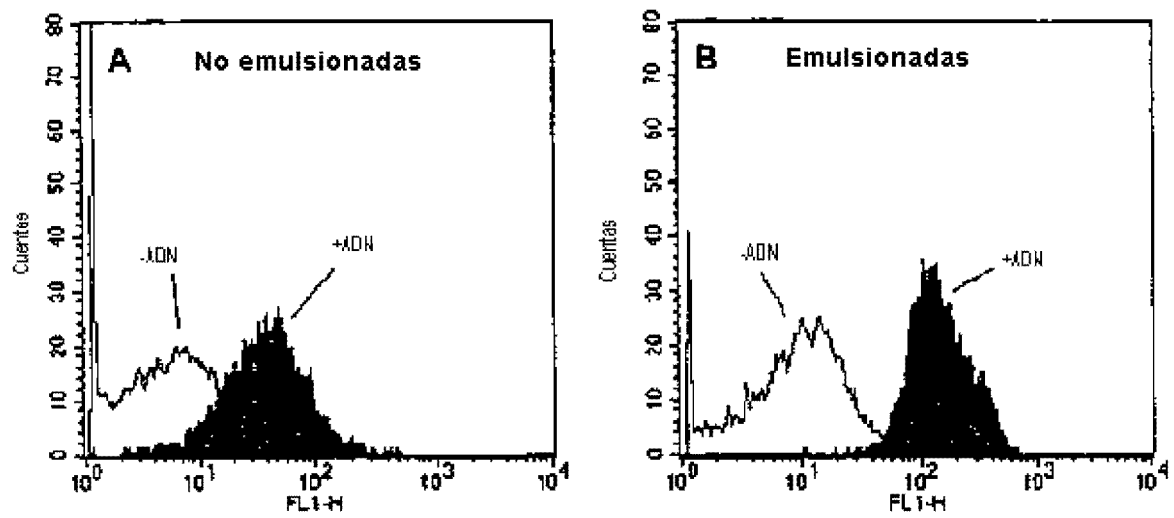


FIGURA 18

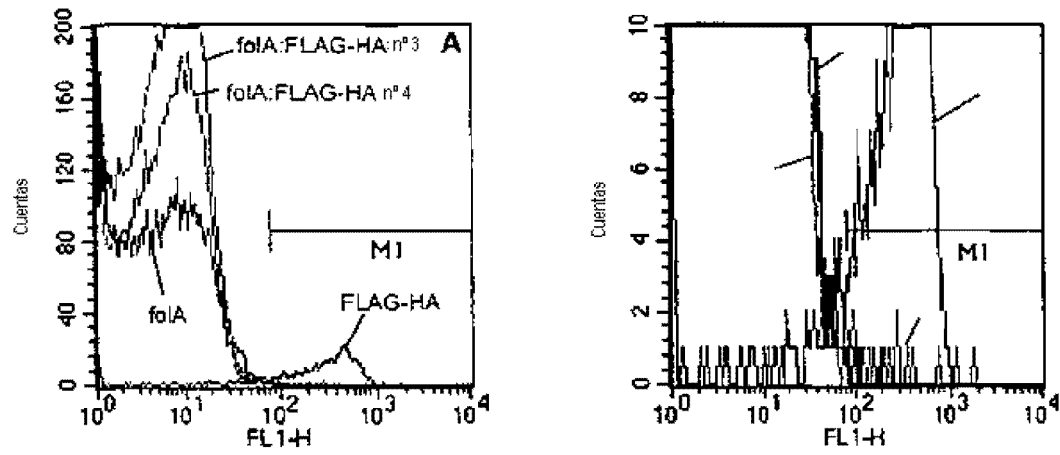


FIGURA 19

