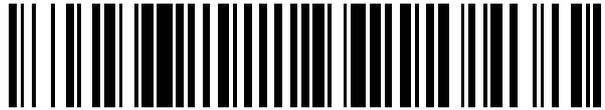


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 516**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.1998 E 07019329 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1908832**

54 Título: **Un procedimiento para incrementar la concentración de una molécula de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**07.07.1997 GB 9714300**

**25.03.1998 GB 9806393**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.05.2013**

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)  
2nd Floor, David Phillips Building, Polaris House,  
North Star Avenue  
Swindon, Wiltshire SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

**GRIFFITHS, ANDREW y  
TAWFIK, DAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 402 516 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

Un procedimiento para incrementar la concentración de una molécula de ácido nucleico

La presente invención se refiere a un procedimiento para incrementar la concentración de una molécula de ácido nucleico.

- 5 La evolución requiere la generación de diversidad genética (diversidad del ácido nucleico) de la que se seleccionarán los ácidos nucleicos que darán lugar a características beneficiosas. Ya que el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado en un organismo están físicamente conectados (al estar los ácidos nucleicos confinados dentro de las células que codifican), una serie de rondas de mutación y selección pueden dar lugar a la supervivencia progresiva de organismos cada vez más adaptados. Los sistemas para la evolución rápida  
10 *in vitro* de los ácidos nucleicos o de las proteínas deben imitar este proceso a nivel molecular en que deben estar conectados el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado, y se debe poder seleccionar la actividad del producto génico.

- Los avances recientes de la biología molecular han permitido seleccionar a la vez algunas moléculas de acuerdo con sus propiedades junto a los ácidos nucleicos que las codifican. Posteriormente, los ácidos nucleicos seleccionados  
15 se pueden clonar para otros análisis o usos, o se pueden someter a más rondas de mutación y selección.

Estos procedimientos tienen en común el establecimiento de grandes genotecas de ácidos nucleicos. Las moléculas que tienen las características (actividad) deseadas se pueden aislar mediante pautas de selección que favorecen el aislamiento de la actividad deseada del producto génico que codifican, tal como una actividad bioquímica o biológica deseada, por ejemplo, actividad fijadora.

- 20 La tecnología de exposición en fagos ha ofrecido muchos éxitos a la hora de proporcionar un vehículo que permita la selección de una proteína expuesta al proporcionar la conexión esencial entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado (Smith, 1985; Bass et al., 1990; McCafferty et al., 1990; para una revisión, véase Clackson y Wells, 1994). Las partículas de fagos filamentosos actúan como paquetes de exposición genética en los que las proteínas están en el exterior y los elementos genéticos que las codifican están en el interior. La conexión  
25 fuerte entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado es resultado del ensamblaje de los fagos dentro de las bacterias. Como cada bacteria es muy raro que se infecte a la vez por varias partículas víricas, en la mayoría de los casos todos los fagos que produce una determinada bacteria llevarán el mismo elemento genético y expondrán la misma proteína.

- Sin embargo, la exposición en fagos se basa en la creación *in vivo* de genotecas de ácidos nucleicos en las bacterias. Por lo tanto, la limitación práctica del tamaño de la genoteca que permite la tecnología de exposición en fagos es del orden de  $10^7$  a  $10^{11}$ , incluso aprovechándose de los vectores derivados del fago  $\lambda$  con replicones escindibles de fagos filamentosos. La técnica se ha aplicado principalmente para seleccionar moléculas con actividad fijadora. También se han aislado utilizando esta técnica una pequeña cantidad de proteínas con actividad catalítica; sin embargo, la selección por la actividad catalítica deseada no fue en ningún caso directa, sino que más  
30 bien se seleccionó por fijación a un análogo del estado de transición (Widersten y Mannervik, 1995) o por reacción con un inhibidor suicida (Soumillion et al., 1994; Janda et al., 1997).

- Los ligandos peptídicos específicos que se fijan a receptores han sido seleccionados mediante selección por afinidad con el uso de grandes genotecas de péptidos conectados al extremo carboxilo de LacI, el represor del operón *lac* (Cull et al., 1992). Cuando se expresa en *E. coli*, la proteína represora conecta físicamente el ligando al  
40 plásmido codificante mediante la fijación a una secuencia del operador de *lac* en el plásmido.

También se ha descrito un sistema de exposición de polisomas completamente *in vitro* (Mattheakis et al., 1994) en el cual los péptidos nacientes se unen físicamente, mediante el ribosoma, al ARN que los codifica.

Sin embargo, el alcance de los sistemas anteriores se limita a la selección de proteínas y además no permite la selección directa de ninguna actividad que no sea la de fijación, por ejemplo, actividad catalítica o reguladora.

- 45 La selección y evolución *in vitro* de ARN (Ellington y Szostak, 1990), a veces denominada SELEX (por la expresión inglesa que significa evolución sistemática de los ligandos mediante el enriquecimiento exponencial) (Tuerk y Gold, 1990) permite la selección por la actividad de fijación y por la actividad química, pero sólo para los ácidos nucleicos. Cuando se selecciona por fijación, se incuba un conjunto de ácidos nucleicos con el sustrato inmovilizado. Se lava todo lo que no se haya fijado, luego se libera lo que se haya fijado, se amplifica y se repite todo el proceso en etapas iterativas para que se enriquezca en las secuencias que se fijan mejor. Este procedimiento también puede adaptarse  
50 para permitir el aislamiento de ARN catalítico y ADN (Green y Szostak, 1992; para revisiones véase Chapman y Szostak, 1994; Joyce, 1994; Gold et al., 1995; Moore, 1995).

Sin embargo, sólo se puede seleccionar por la actividad «catalítica» o fijadora con SELEX porque la misma molécula desempeña la doble función de llevar la información genética y de ser la molécula catalizadora o fijadora (aptámero).

5 Cuando se selecciona por la «autocatálisis», la misma molécula debe también realizar la tercera función de ser un sustrato. Dado que el elemento genético debe desempeñar las funciones de ser el sustrato y el catalizador, solo se pueden seleccionar los acontecimientos de recambio únicos. Dado que el «catalizador» se modifica a sí mismo en este proceso, por definición no es un verdadero catalizador. Además, las proteínas no se pueden seleccionar con el procedimiento SELEX. Por lo tanto, el abanico de catalizadores, sustratos y reacciones que se puede seleccionar está muy limitado.

10 Los procedimientos anteriores que permiten reiterar las rondas de mutación y selección están imitando los mecanismos *in vitro* que se suelen adscribir al proceso de la evolución: la variación iterativa, la selección progresiva de una actividad deseada, y la replicación. No obstante, ninguno de los procedimientos desarrollados hasta ahora han proporcionado moléculas de una diversidad y eficacia funcional comparables a los que se encuentran de forma natural. Además, no hay ningún sistema de «evolución» hecho por el hombre que pueda hacer evolucionar tanto los ácidos nucleicos como las proteínas para que afecten al abanico completo de actividades biológicas y bioquímicas (por ejemplo, actividades fijadora, catalítica y reguladora), y que pueda combinar varios procesos para conducir al producto o actividad deseados.

15 Por consiguiente, existe una enorme necesidad de un sistema *in vitro* que supere las limitaciones que se acaban de explicar.

20 La patente internacional WO 93/03151 describe un procedimiento para tratar una población heterogénea de células que conectan copias de dos o más secuencias de ácido nucleico de las células, en donde las copias de las secuencias de ADN de cada célula en particular están preferiblemente conectadas en la vecindad del ácido nucleico de la cual proceden las copias.

#### Breve descripción de la invención

De acuerdo con la invención, se da a conocer un procedimiento para incrementar la concentración de una molécula de ácido nucleico, en donde dicho procedimiento comprende:

- 25 (a) la formación de microcápsulas acuosas a partir de una emulsión de aceite en agua, en donde una gran cantidad de las microcápsulas incluye una molécula de ácido nucleico y una solución acuosa que comprende los componentes necesarios para la amplificación del ácido nucleico; y
- (b) la amplificación de la molécula de ácido nucleico en las microcápsulas para formar más copias amplificadas de dicha molécula de ácido nucleico,

en donde las microcápsulas compartimentan una genoteca de moléculas de ácido nucleico.

30 De acuerdo con un primer aspecto de la descripción, se da a conocer un procedimiento para aislar uno o varios elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad deseada, que comprende las etapas de:

- (a) la compartimentación de los elementos genéticos en las microcápsulas;
- 35 (b) la expresión de los elementos genéticos para producir sus productos génicos correspondientes dentro de las microcápsulas;
- (c) la clasificación de los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada.

40 Las microcápsulas de acuerdo con la presente descripción compartimentan los elementos genéticos y los productos génicos de tal forma que permanecen físicamente conectados. Sorprendentemente, la expresión del ácido nucleico sigue siendo posible dentro de las microcápsulas artificiales que permiten el aislamiento del ácido nucleico basándose en la actividad del producto génico que codifica.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un elemento genético es una molécula o 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 los mismos). Además, el componente de ácido nucleico del elemento genético puede conectarse, covalente o no covalentemente, a una o más moléculas o estructuras, que incluyen proteínas, entidades o grupos químicos, soportes en fase sólida tal como perlas magnéticas, y similares. Estas estructuras o moléculas se pueden diseñar para ayudar a la clasificación y/o aislamiento del elemento genético que codifica un producto génico con la actividad deseada.

50 La terminología expresión, tal y como se utiliza en la presente memoria, se utiliza en su sentido más amplio para significar que un ácido nucleico contenido en el elemento genético se convierte en su producto génico. Por lo 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 puede también referirse a la traducción del ARN en la proteína. Cuando el ácido nucleico es ARN, la expresión puede referirse a la replicación de este ARN en más copias de ARN, la transcripción inversa del ARN en ADN y, opcionalmente, la transcripción de este ADN en una o más moléculas de ARN, así como opcionalmente la traducción de cualquiera de las especies de ARN producidas en la proteína. Por consiguiente, 5 preferiblemente, la expresión se realiza mediante uno o más de los procesos seleccionados del grupo que consiste en transcripción, transcripción inversa, replicación y traducción.

Así pues, la expresión del elemento genético puede desembocar en ADN, ARN o proteína, o un ácido nucleico o proteína que contiene bases o aminoácidos (el producto génico) que no son naturales dentro de la microcápsula, de tal forma que el producto génico está confinado dentro de la misma microcápsula que el elemento genético.

10 El elemento genético y el producto génico codificados de este modo están conectados al quedar confinado cada elemento genético y el correspondiente producto génico codificado por el elemento genético dentro de la misma microcápsula. De este modo, el producto génico de una microcápsula no puede ocasionar ningún cambio en ninguna otra microcápsula.

15 La terminología «microcápsula» se utiliza en la presente memoria de acuerdo con el significado normalmente asignado a ésta en la técnica y descrito con más detalle más adelante en la presente memoria. Sin embargo, en esencia, una microcápsula es un compartimento artificial cuyas fronteras delimitadoras restringen el intercambio de los componentes de los mecanismos moleculares descritos en la presente memoria que permiten la clasificación de los elementos genéticos de acuerdo con la función de los productos génicos que codifican.

20 Preferiblemente, serán posible producir las microcápsulas utilizadas en el procedimiento de la presente descripción en cantidades muy grandes y, por lo tanto, de compartimentar una genoteca de elementos genéticos que codifica un repertorio de productos génicos.

De acuerdo con una realización preferente del primer aspecto de la presente descripción, la clasificación de los elementos genéticos puede realizarse con una de esencialmente cuatro técnicas.

25 (i) En una primera realización, las microcápsulas se clasifican de acuerdo con una actividad del producto génico o derivado del mismo que hace que la microcápsula se pueda detectar como un todo. Por consiguiente, la descripción da a conocer un procedimiento en donde un producto génico con la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula, o una modificación de una o varias moléculas dentro de la microcápsula, lo que permite la clasificación de la microcápsula que contiene el producto génico y el elemento genético que lo codifica. Por lo tanto, en esta realización, las microcápsulas se clasifican 30 físicamente a partir del conjunto de acuerdo con la actividad del producto o de los productos génicos expresados a partir del o de los elementos genéticos contenidos en éste, lo que hace posible el enriquecimiento selectivo de las microcápsulas que contienen los productos génicos de la actividad deseada.

35 (ii) En una segunda realización, los elementos genéticos se clasifican después de reunir las microcápsulas en uno o varios compartimentos comunes. En esta realización, un producto génico que tiene la actividad deseada modifica el elemento genético que lo codifica (y que reside en la misma microcápsula) de tal modo que permite su selección en una etapa posterior. Se paran las reacciones y a continuación se rompen las microcápsulas de tal forma que se junta todo el contenido de las microcápsulas individuales. La selección 40 por los elementos genéticos modificados permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el o los productos génicos que tienen la actividad deseada. Por consiguiente, la descripción da a conocer un procedimiento en donde, en la etapa (b), el producto génico que tiene la actividad deseada modifica el elemento genético que lo codifica para permitir el aislamiento del elemento genético. Por supuesto, se debe saber que la modificación puede ser directa, esto es, que está ocasionada por la acción directa del producto génico sobre el elemento genético, o indirecta, en la que una serie de reacciones, en 45 una o más de las cuales interviene el producto génico que tiene la actividad deseada, conduce a la modificación del elemento genético.

50 (iii) En una tercera realización, los elementos genéticos se clasifican después de la reunión de las microcápsulas en uno o más compartimentos comunes. En esta realización, un gen con una actividad deseada induce un cambio en la microcápsula que contiene el producto génico y el elemento genético que lo codifica. Este cambio, cuando se detecta, desencadena la modificación del gen dentro del compartimento. Se paran las reacciones y entonces se rompen las microcápsulas de tal forma que se reúne todo el contenido de cada una de las microcápsulas. La selección por los elementos genéticos modificados permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el o los productos génicos que tienen la actividad deseada. Por consiguiente, la descripción da a conocer un procedimiento en donde en la etapa 55 (b) el producto génico que tiene la actividad deseada induce un cambio en el compartimento que se detectará y desencadenará la modificación del elemento genético dentro del compartimento para permitir su aislamiento. Hay que saber que el cambio detectado en el compartimento puede estar ocasionado por la

acción directa del producto génico, o por su acción indirecta, en la que una serie de reacciones, en una o varias de las cuales interviene el producto génico que tiene la actividad deseada, conduce al cambio detectado.

- 5 (iv) En una cuarta realización, los elementos genéticos se pueden clasificar mediante un procedimiento por etapas, que implica al menos dos etapas, por ejemplo, para permitir la exposición de los elementos genéticos a las condiciones que permiten que se produzcan al menos dos reacciones independientes. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, la primera etapa de microencapsulación debe dar lugar a unas condiciones que permiten la expresión de los elementos genéticos, bien sea transcripción, transcripción y/o traducción, replicación o similares. En estas condiciones podría resultar imposible la selección por una actividad del producto génico concreto, por ejemplo, porque el producto génico puede estar inactivo en estas condiciones, o porque el sistema de expresión contiene una actividad interferente. Por lo tanto, la descripción da a conocer un procedimiento, en donde la etapa (b) comprende expresar los elementos genéticos para producir sus productos génicos correspondientes dentro de las microcápsulas, con la conexión de los productos génicos a los elementos genéticos que los codifican y el aislamiento de los complejos así formados. Esto garantiza que los elementos genéticos y sus productos génicos asociados se aíslan de las cápsulas antes de clasificarlos de acuerdo con la actividad del producto génico que se sintetiza. En una realización preferente, los complejos se someten a una etapa adicional de compartimentación antes de aislar los elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene la actividad deseada. Esta etapa de compartimentación adicional, que ventajosamente tiene lugar en las microcápsulas, permite llevar a cabo más reacciones, en diferentes condiciones, en un entorno donde los elementos genéticos y sus respectivos productos génicos están físicamente conectados. La clasificación final de los elementos genéticos puede realizarse de acuerdo con la realización (I), (II) o (III) de más arriba.

La «encapsulación secundaria» también puede realizarse con los elementos genéticos conectados a los productos génicos mediante otros medios, tal como exposición en fagos, exposición en polisomas, fusión del péptido al ARN o fusión del péptido al represor de *lac*.

El elemento o elementos genéticos seleccionados también pueden someterse a posteriores rondas, posiblemente más rigurosas, de clasificación en etapas repetidas iterativamente, volviendo a aplicar el procedimiento de la descripción bien en su totalidad o bien sólo determinadas etapas. Con la conveniente adaptación de las condiciones, después de cada ronda de selección se pueden aislar los elementos genéticos que codifican los productos génicos que tienen una actividad mejor y optimizada.

Además, los elementos genéticos aislados tras una primera ronda de clasificación pueden someterse a mutagénesis antes de repetir la clasificación mediante la repetición iterativa de la etapas del procedimiento de la descripción tal y como se estableció más arriba. Después de cada ronda de mutagénesis, algunos elementos genéticos se habrán modificado de tal modo que se potencia la actividad de los productos génicos.

Además, los elementos genéticos seleccionados se pueden clonar en un vector de expresión para permitir la caracterización adicional de los elementos genéticos y de sus productos.

En un segundo aspecto, la descripción da a conocer un producto cuando se selecciona de acuerdo con el primer aspecto de la descripción. Tal y como se usa en este contexto, un «producto» puede referirse a un producto génico, que se puede seleccionar de acuerdo con la descripción, o el elemento genético (o la información genética comprendida en éste).

En un tercer aspecto, la descripción da a conocer un procedimiento para preparar un producto génico, que comprende las etapas de:

- (a) preparar un elemento genético que codifica el producto génico;
- (b) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas;
- 45 (c) expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos dentro de las microcápsulas;
- (d) clasificar los elementos genéticos que producen el o los productos génicos que tienen la actividad deseada;
- y
- (e) expresar el producto génico que tiene la actividad deseada.

50 De acuerdo con el tercer aspecto, la etapa (a) comprende preferentemente la preparación de un repertorio de elementos genéticos, en donde cada elemento genético codifica un producto génico potencialmente diferente. Los repertorios pueden generarse mediante técnicas convencionales, tal como las empleadas para la generación de genotecas diseñadas para la selección por procedimientos tales como la exposición en fagos. Los productos génicos

que tienen la actividad deseada pueden seleccionarse del repertorio, de acuerdo con la presente descripción.

En un cuarto aspecto, la descripción da a conocer un procedimiento para escrutar un compuesto o compuestos capaces de modular la actividad de un producto génico, que comprende las etapas de:

- (a) preparar un repertorio de elementos genéticos que codifican productos génicos;
- 5 (b) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas;
- (c) expresar los elementos genéticos para producir sus correspondientes productos génicos dentro de las microcápsulas;
- (d) clasificar los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada; y
- 10 (e) poner en contacto un producto génico que tiene la actividad deseada con el compuesto o compuestos y monitorizar la modulación de una actividad del producto génico mediante el compuesto o compuestos.

Ventajosamente, el procedimiento comprende además la etapa de:

- (f) identificar el compuesto o compuestos capaces de modular la actividad del producto génico y sintetizar dicho compuesto o compuestos.
- 15 Este sistema de selección puede configurarse para seleccionar ARN, ADN o moléculas proteicas con actividad catalítica, reguladora o fijadora.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1:

Selección génica por compartimentación.

- 20 a. *Representación esquemática del procedimiento de selección.* En la *etapa 1*, para formar una emulsión de aceite en agua con típicamente un elemento genético por compartimento acuoso se dispersa una mezcla de reacción para transcripción/traducción *in vitro* que contiene una genoteca de elementos genéticos conectados a un sustrato para la reacción que se quiere seleccionar. Los elementos genéticos se transcriben y traducen dentro de sus compartimentos (*etapa 2*). Posteriormente (*etapa 3*), las proteínas (o los ARN) con actividad enzimática convierten el sustrato en un producto que permanece conectado al elemento genético. La compartimentación impide la modificación de los elementos genéticos en otros compartimentos. A continuación (*etapa 4*), se rompe la emulsión, se paran todas las reacciones y se combinan los compartimentos acuosos. Los elementos genéticos que están conectados al producto se enriquecen selectivamente, luego se amplifican, y o bien se caracterizan (*etapa 5*) o bien se conectan al sustrato y se compartimentan para las rondas de selección (*etapa 6*) adicionales.
- 25
- 30 b. *Selección de la metilación del ADN específica de la diana mediante la metilasa HaeIII.* El sustrato es un segmento de ADN que contiene sitios de restricción/modificación (R/M) de *HaeIII*. Los elementos genéticos se aíslan al fijarlos a perlas magnéticas revestidas con estreptavidina y se tratan con la enzima de restricción cognada *HaeIII*. Sólo resisten la escisión los ácidos nucleicos con sitios de R/M metilados, y posteriormente se amplifican por PCR.

Figura 2a:

- 35 *Distribución de las gotitas por tamaño y actividad de la DHFR y de la metilasa HaeIII en las emulsiones: distribución de los compartimentos acuosos por tamaño en una emulsión, según se determina mediante difracción por láser.* Las mezclas de reacción de transcripción/traducción *in vitro* que contienen el ADN y el desoxicolato de sodio se emulsionan por agitación, o por agitación y posterior homogeneización a 8000, 9500 o 13.500 rpm. La distribución por tamaños de las partículas acuosas se muestra mediante el porcentaje del volumen acuoso total.

40 Figura 2b:

- La actividad de la DHFR formada in situ mediante la transcripción y la traducción de su gen (figura 1b) en los compartimentos acuosos de una emulsión.* La concentración del gen *folA* utilizado (2,5 nM) da una media de un gen por gotita en las emulsiones más minúsculas (homogeneizadas a 13.500 rpm). El diámetro medio calculado a partir de los datos de distribución de los tamaños (en la figura 2a) se presenta en función de la velocidad de homogeneización (0 rpm se refiere a la emulsión preparada por agitación sin ninguna otra homogeneización). La actividad se presenta como el porcentaje de la actividad observada en las mismas condiciones en la mezcla de reacción *in vitro* que no se emulsionó.
- 45

*La actividad de la metilasa HaeIII formada in situ mediante la transcripción y traducción de su gen (figura 1b) en los*

compartimentos acuosos de una emulsión. La concentración del gen *M.HaeIII* utilizado (2,5 nM da una media de un gen por gotita en las emulsiones más minúsculas (homogeneizadas a 13.500 rpm). El diámetro medio calculado a partir de los datos de distribución de los tamaños (en la figura 2a) se presenta en función de la velocidad de homogeneización (0 rpm se refiere a la emulsión preparada por agitación sin ninguna otra homogeneización). La actividad se presenta como el porcentaje de la actividad observada en las mismas condiciones en la mezcla de reacción *in vitro* que no se emulsionó.

Figura 3:

Selecciones de la ADN metilasa *HaeIII*.

a. Selección de genes *M.HaeIII* a partir de un exceso de 1000 veces de genes *foIA*. Las reacciones se montaron con ADN de DIG-*foIA*-3s-Biotina a 0,2 nM (que corresponde a una media de un gen por compartimento), y se enriquecieron con DIG-*M.HaeIII*-3s-Biotina a 0,2 pM. Las mezclas de reacción se emulsionaron por agitación o se dejaron en disolución. El ADN de estas reacciones se capturó, se digirió con *HaeIII* (o con *HhaI*) y se amplificó por PCR. Este ADN se amplificó además por PCR anidada con los cebadores LMB2-Nest y LMB3-Nest y se migraron 5 µl de cada PCR anidada en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que contenía bromuro de etidio. Marcadores: ΦX174 digerido con *HaeIII*; sin T7: no hay ARN polimerasa de T7; sin dCNa: sin desoxicolato de sodio.

b. Selecciones en dos rondas. Las reacciones que contienen una proporción molar de 1:10<sup>4</sup> a 1:10<sup>7</sup> de DIG-*M.HaeIII*-3s-Biotina: DIG *foIA*-3s-Biotina (a 500 pM) se emulsionan por agitación. El ADN de estas reacciones se digiere con *HaeIII* y se amplifica por PCR con los cebadores LMB2-Biotina (SEQ ID n.º 9) y LMB3-DIG (SEQ ID n.º 10). El ADN amplificado de la primera ronda de selección de las proporciones 1:10<sup>4</sup> y 1:10<sup>5</sup> (a 20 pM) y de las proporciones 1:10<sup>6</sup> y 1:10<sup>7</sup> (a 500 pM) se pone en una segunda ronda de selección. Este ADN se amplificó además por PCR anidada con los cebadores LMB2-Nest y LMB3-Nest y se analizaron 5 µl de la PCR anidada de cada ronda de selección mediante electroforesis en gel como más arriba (panel superior). El mismo ADN se tradujo *in vitro* y se midió la actividad metilasa resultante. Los resultados se presentan como el porcentaje del ADN del sustrato metilado (panel inferior).

## 25 Descripción detallada de la invención y de la descripción

### (A) Descripción general

Las microcápsulas de la presente invención y descripción requieren unas propiedades físicas adecuadas para permitir el funcionamiento de la invención y descripción.

Primero, para asegurar que los elementos genéticos y los productos génicos no puedan difundirse entre las microcápsulas, el contenido de cada microcápsula debe estar aislado del contenido de las microcápsulas circundantes, de manera que no haya intercambio, o haya poco, de los elementos genéticos ni de los productos génicos entre las microcápsulas durante la duración del experimento.

Segundo, el procedimiento de la presente descripción requiere que haya sólo un escaso número de elementos genéticos por microcápsula. Esto asegura que el producto génico de un elemento genético individual esté aislado de otros elementos genéticos. Así pues, el acoplamiento entre el elemento genético y el producto génico será muy específico. El factor de enriquecimiento mayor se da con una media de uno o menos elementos genéticos por microcápsula, en donde la conexión entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado es tan fuerte como es posible, dado que el producto génico de un elemento genético individual estará aislado de los productos de todos los otros elementos genéticos. Sin embargo, incluso si no se utiliza la situación teóricamente óptima de, por media, un único elemento genético o menos por microcápsula, puede resultar beneficiosa una proporción de 5, 10, 50, 100 o 1000 o más elementos genéticos por microcápsula para clasificar una genoteca grande. Las posteriores rondas de clasificación, entre ellas la renovación de la encapsulación con una distribución diferente de los elementos genéticos, permitirá una clasificación más rigurosa de los elementos genéticos. Preferiblemente, hay un único elemento genético, o menos, por microcápsula.

Tercero, la formación y la composición de las microcápsulas no debe destruir el funcionamiento de la maquinaria de expresión de los elementos genéticos ni la actividad de los productos génicos.

Por consiguiente, cualquier sistema de microencapsulación utilizado debe satisfacer estos tres requisitos. El sistema o sistemas apropiados puede variar según la naturaleza exacta de los requisitos en cada aplicación de la descripción, como resultará evidente al experto en la técnica.

Está disponible una amplia gama de procedimientos de microencapsulación (véase Benita, 1996) y se debe utilizar para crear las microcápsulas utilizadas de acuerdo con la presente invención y descripción. De hecho, en la bibliografía se han identificado más de 200 procedimientos de microencapsulación (Finch, 1993).

Éstos incluyen vesículas acuosas rodeadas de membrana tales como vesículas lipídicas (liposomas) (New, 1990) y

vesículas de tensioactivos no iónicos (van Hal et al., 1996). Éstas son cápsulas rodeadas por una membrana de una única bicapa o de varias bicapas de moléculas ensambladas no covalentemente, en donde cada bicapa está separada de la vecina por un compartimento acuoso. En el caso de los liposomas, la membrana está compuesta por moléculas lipídicas; éstas son normalmente fosfolípidos, pero estas membranas también pueden incorporar esterol, tales como el colesterol (New, 1990). Dentro de los liposomas se pueden realizar numerosas reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas, entre ellas la polimerización del ARN y del ADN (Chakrabarti et al., 1994; Oberholzer et al., 1995a; Oberholzer et al., 1995b; Walde et al., 1994; Wick & Luisi, 1996).

Con un sistema de vesículas envueltas por membranas, la mayor parte de la fase acuosa está en el exterior de las vesículas y, por lo tanto, no está compartimentada. Se debe retirar esta fase acuosa continua o se deben inhibir o destruir los sistemas biológicos que hay en ella (por ejemplo, mediante digestión de los ácidos nucleicos con ADNasa o ARNasa) para que las reacciones se circunscriban a las microcápsulas (Luisi et al., 1987).

También se ha demostrado que las reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas pueden tener lugar en las microcápsulas generadas por una serie de procedimientos diferentes. Muchas enzimas están activas en las soluciones 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; Perez et al., 1992; Walde et al., 1994; Walde et al., 1993; Walde et al., 1988) tal como el sistema de agua-isooctano-AOT (Menger y Yamada, 1979).

Las microcápsulas también pueden generarse mediante la polimerización interfacial y la complejación interfacial (Whateley, 1996). Las microcápsulas de esta clase pueden tener membranas impermeables o membranas semipermeables rígidas. Las microcápsulas semipermeables delimitadas por membranas de nitrato de celulosa, membranas de poliamida y membranas de lípidos y poliamida pueden aguantar las reacciones bioquímicas, incluidos los sistemas multienzimáticos (Chang, 1987; Chang, 1992; Lim, 1984). Las microcápsulas de alginato/polilisina (Lim y Sun, 1980), que pueden formarse en condiciones muy suaves, también han resultado ser muy biocompatibles, proporcionando, por ejemplo, un procedimiento eficaz de encapsulación de células y tejidos vivos (Chang, 1992; Sun et al., 1992).

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

Preferiblemente, las microcápsulas de la presente invención y descripción se forman a partir de emulsiones: sistemas heterogéneos de dos fases líquidas inmiscibles con una de las fases dispersa en la otra a modo de gotitas de tamaño microscópico o coloidal (Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1974; Lissant, 1984).

Las emulsiones pueden producirse de cualquier combinación adecuada de líquidos inmiscibles. Preferiblemente, la emulsión de la presente invención y descripción tiene agua (que contiene los componentes bioquímicos) como la fase presente en forma de gotitas muy pequeñas (la fase dispersa, interna o discontinua) y un líquido inmiscible hidrófobo (un «aceite») como la matriz en la que estas gotitas están suspendidas (la fase no dispersa, continua o externa). Tales emulsiones se denominan de «agua en aceite» (W/O, por su nombre en inglés). Esto tiene la ventaja de que la fase acuosa completa que contiene los componentes bioquímicos está compartimentada en gotitas independientes (la fase interior). La fase externa, que es un aceite hidrófobo, por lo general no contiene ninguno de los componentes bioquímicos y, por lo tanto, es inerte.

La emulsión puede establecerse por la adición de uno o más tensioactivos (surfactantes). Estos tensioactivos se denominan emulsionantes y actúan en la interfase agua/aceite para impedir (o al menos retrasar) la separación de las fases. Pueden utilizarse muchos aceites y muchos emulsionantes para generar emulsiones de agua en aceite; una recopilación reciente recoge aproximadamente 16.000 tensioactivos, muchos de los cuales se utilizan como emulsionantes (Ash y Ash, 1993). Los aceites adecuados incluyen tensioactivos no iónicos y aceite mineral incoloro ligero (Schick, 1966) tal como el monooleato de sorbitán (Span<sup>TM</sup> 80; ICI) y el monooleato de polioxietilensorbitán (Tween<sup>TM</sup> 80; ICI).

El uso de los tensioactivos aniónicos también puede ser beneficioso. Los tensioactivos adecuados incluyen colato de sodio y taurocolato de sodio. Particularmente preferido es el desoxicolato de sodio, preferiblemente a una concentración del 0,5% p/v, o inferior. La inclusión de tales tensioactivos puede, en algunos casos, incrementar la expresión de los elementos genéticos y/o la actividad de los productos génicos. La adición de algunos surfactantes aniónicos a una mezcla de reacción que no está emulsionada elimina completamente la traducción. Sin embargo, durante la emulsificación, el tensioactivo se transfiere desde la fase acuosa a la interfaz y se restaura la actividad. La adición de un tensioactivo aniónico a las mezclas a emulsionar garantiza que las reacciones continúen sólo después de la compartimentación.

La creación de una emulsión generalmente requiere la aplicación de energía mecánica para forzar la mezcla de las fases. Existen muchas maneras de realizarlo que utilizan una serie de dispositivos mecánicos, que incluyen agitadores (tal como barras magnéticas para agitación, agitadores con propulsor y de turbina, dispositivos de palas y batidoras manuales), homogeneizadores (entre ellos, homogeneizadores de rotor-estator, homogeneizadores con

válvula de alta presión y homogeneizadores a chorro), molinos coloides, dispositivos de ultrasonido y de «emulsificación de membrana» (Becher, 1957; Dickinson, 1994)

Las microcápsulas acuosas formadas en las emulsiones de aceite en agua son por lo general estables con poco, si es que llega a haberlo, intercambio de elementos genéticos o productos genéticos entre las microcápsulas. Además, hemos demostrado que en las microcápsulas de emulsión tienen lugar varias reacciones bioquímicas. Además, los procesos bioquímicos complicados, notablemente la transcripción y la traducción del gen, también están activos en las microcápsulas de emulsión. Existe la tecnología necesaria para crear emulsiones escalables a todo tipo de volúmenes industriales de miles de litros (Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1974; Lissant, 1984).

El tamaño de la microcápsula preferida variará según los requisitos precisos de cualquier proceso de selección individual que se realiza de acuerdo con la presente invención o descripción. En todos los casos habrá un equilibrio óptimo entre el tamaño de la genoteca, el enriquecimiento requerido y la concentración requerida de componentes en cada microcápsula para conseguir una expresión eficaz y la reactividad de los productos genéticos.

Los procesos de expresión deben producirse dentro de cada una de las microcápsulas dadas a conocer por la presente descripción. Tanto la transcripción *in vitro* como la transcripción-traducción acopladas se vuelven menos eficaces a concentraciones de ADN subnanomolares. Debido al requisito de que en cada microcápsula sólo haya un número escaso de moléculas de ADN, existe, por lo tanto, un límite superior práctico para el posible tamaño de la microcápsula. Preferiblemente, el volumen medio de las microcápsulas es de menos que  $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$  (que corresponde a una microcápsula esférica de un diámetro de menos de  $10 \mu\text{m}$ , más preferiblemente de menos de  $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$  ( $5 \mu\text{m}$ ), más preferiblemente unos  $4,2 \times 10^{-18} \text{ m}^3$  ( $2 \mu\text{m}$ ) e, idealmente, aproximadamente  $9 \times 10^{-18} \text{ m}^3$  ( $2,6 \mu\text{m}$ ).

La concentración eficaz de ARN o ADN en las microcápsulas puede incrementarse artificialmente mediante distintos procedimientos que conocerán bien los expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la adición de sustancias químicas excluyentes de volumen, tal como polietilenglicoles (PEG) y una serie de técnicas de amplificación génica, entre ellas la transcripción con ARN polimerasas que incluyen las de bacterias tales como *E. coli* (Roberts, 1969; Blattner y Dahlberg, 1972; Roberts et al., 1975; Rosenberg et al., 1975), eucariotas, p. ej. (Weil et al., 1979; Manley et al., 1983) y bacteriófagos tal como T7, T3 y SP6 (Melton et al., 1984); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988); amplificación con la replicasa de Q $\beta$  (Miele et al., 1983; Cahill et al., 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev et al., 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por su nombre en inglés) (Landegren et al., 1988; Barany, 1991); y el sistema de replicación de secuencias autosostenido (Fahy et al., 1991) y amplificación por desplazamiento de hebras (Walker et al., 1992). Incluso las técnicas de amplificación génica que requieren el termociclado tal como la PCR y la LCR podrían utilizarse si son termoestables las emulsiones y los sistemas *in vitro* de transcripción o de traducción-transcripción acopladas (por ejemplo, los sistemas de transcripción-traducción acopladas podrían construirse a partir de un organismo termoestable tal como *Thermus aquaticus*).

El incremento de la concentración local eficaz de ácido nucleico permite utilizar con más eficacia las microcápsulas más grandes. Esto permite que el límite superior práctico preferido para el volumen de microcápsula sea de unos  $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$  (que corresponde a una esfera con un diámetro de  $10 \mu\text{m}$ ).

El tamaño de las microcápsulas debe ser suficientemente grande para acomodar todos los componentes requeridos para las reacciones bioquímicas que se necesita 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 trifosfatos de nucleósidos de aproximadamente 2 mM.

Por ejemplo, para transcribir un gen en una molécula de ARN corta de 500 bases de longitud se requeriría un mínimo de 500 moléculas de trifosfato de nucleósido por microcápsula ( $8,33 \times 10^{-22} \text{ mol}$ ). Para constituir una solución a 2 mM, este número de moléculas debe estar contenido dentro de una microcápsula cuyo volumen es  $4,17 \times 10^{-19} \text{ l}$  ( $4,17 \times 10^{-22} \text{ m}^3$ ) que, si fuera esférica, tendría un diámetro de 93 nm.

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

Por consiguiente, el volumen de las microcápsulas está preferiblemente en el orden de entre  $5,2 \times 10^{-22} \text{ m}^3$  y  $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$  que corresponden a esferas con un diámetro entre  $0,1 \mu\text{m}$  y  $10 \mu\text{m}$ , más preferiblemente entre aproximadamente  $5,2 \times 10^{-19} \text{ m}^3$  y  $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$  ( $1 \mu\text{m}$  y  $5 \mu\text{m}$ ). Las esferas con un diámetro de unos  $2,6 \mu\text{m}$  son las más ventajosas.

No es una coincidencia que las dimensiones preferidas de los compartimentos (gotitas con un diámetro medio de  $2,6 \mu\text{m}$ ) se parezcan mucho a las de las bacterias, por ejemplo, *Escherichia* son bacilos de  $1,1\text{-}1,5 \times 2,0\text{-}6,0 \mu\text{m}$  y *Azotobacter* son células ovoides con un diámetro de  $1,5\text{-}2,0 \mu\text{m}$ . En su forma más simple, la evolución darwiniana se

basa en un mecanismo de «un genotipo, un fenotipo». La concentración de un único gen, o genoma, compartimentado cae de 0,4 nM en un compartimento con un diámetro de 2 µm, a 25 pM en un compartimento con un diámetro de 5 µm. La maquinaria de la transcripción/traducción procariota ha evolucionado para operar en compartimentos con un diámetro de unos 1-2 µm, en donde los genes únicos se encuentran a una concentración de aproximadamente el orden nanomolar. Un gen único, en un compartimento con un diámetro de 2,6 µm, se encuentra a una concentración de 0,2 nM. Esta concentración génica es suficientemente alta para una traducción eficaz. La compartimentación en tal volumen también asegura que incluso si sólo se forma una única molécula del producto génico, esté presente a aproximadamente 0,2 nM, lo cual es importante si el producto génico debe tener una actividad modificadora del propio elemento genético. Así pues, el volumen de la microcápsula debe seleccionarse teniendo en cuenta no solamente los requisitos para la transcripción y la traducción del elemento genético, sino también la actividad modificadora del producto génico requerida en el procedimiento de la descripción.

El tamaño de las microcápsulas en emulsión puede variar simplemente adaptando las condiciones de emulsión utilizadas para formar la emulsión de acuerdo con los requisitos del sistema de selección. Cuanto mayor es el tamaño de la microcápsula, mayor es el volumen que se requerirá para encapsular un determinado elemento de la genoteca, ya que el factor limitante final será el tamaño de la microcápsula y, por consiguiente, el número de microcápsulas posible por volumen unitario.

El tamaño de las microcápsulas se selecciona no sólo teniendo en cuenta los requisitos del sistema de transcripción/traducción, sino también los del sistema de selección empleado para el elemento genético. Así pues, los componentes del sistema de selección, tal como un sistema de modificación química, puede requerir volúmenes de reacción y/o concentraciones de reactivos que no son óptimos para la transcripción/traducción. Tal y como se presenta en la presente memoria, tales requisitos pueden acomodarse mediante una etapa de reencapsulación posterior; además, se pueden acomodar mediante la selección del tamaño de las microcápsulas para aumentar al máximo la transcripción/traducción y la selección como un todo. Se prefiere la determinación empírica del volumen óptimo de las microcápsulas y de la concentración de los reactivos, por ejemplo, tal y como se presenta en la presente memoria.

Un «elemento genético» de acuerdo con la presente invención es tal y como se describe más arriba. Preferiblemente, un elemento genético es una molécula o construcción seleccionada del grupo que consiste en una molécula de ADN, una molécula de ARN, una molécula de ácido nucleico parcial o completamente artificial que consiste en bases exclusivamente sintéticas o una mezcla de bases sintéticas y que se producen de forma natural, cualquiera de lo anterior conectado a un polipéptido, y cualquiera de lo anterior conectado a cualquier otro grupo molecular o construcción. Ventajosamente, el otro grupo o construcción molecular puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos nucleicos, sustancias poliméricas, en espacial perlas, por ejemplo, perlas de poliestireno, sustancias magnéticas tal como perlas magnéticas, marcadores, tales como fluoróforos o marcadores isotópicos, reactivos químicos, fijadores tales como macrociclos y similares.

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

Tal y como será evidente a partir de lo que sigue, en muchos casos el polipéptido u otro grupo o construcción molecular es un ligando o un sustrato que directa o indirectamente se fija al producto génico, o reacciona con él, para etiquetar el elemento genético. Esto permite clasificar el elemento genético sobre la base de la actividad del producto génico.

El ligando o sustrato puede estar conectado al ácido nucleico mediante muy distintos medios que serán evidentes para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, 1996). Bastará una etiqueta que permita la selección posterior del elemento genético. La clasificación puede ser mediante cualquier procedimiento que permita la separación, amplificación o supervivencia preferenciales del elemento genético etiquetado. Los ejemplos incluyen la selección por fijación (que incluye las técnicas basadas en la separación magnética, por ejemplo, con Dynabeads™), y mediante resistencia a la degradación (por ejemplo, mediante nucleasas, incluidas las endonucleasas de restricción).

Un modo mediante el cual la molécula de ácido nucleico puede quedar conectada a un ligando o sustrato es mediante biotilación. Esto se puede realizar mediante amplificación por PCR con un cebador biotilado en 5' de tal forma que el ácido nucleico y la biotina se conectan covalentemente.

El ligando o sustrato a seleccionar se puede pegar al ácido nucleico modificado mediante una serie de medios que serán evidentes para los expertos en la técnica. Un ácido nucleico biotilado puede estar acoplado a una microperla de poliestireno (con un diámetro de 0,035 a 0,2 µm) que está revestida con avidina o estreptavidina que, por lo tanto, se fijará al ácido nucleico con una afinidad muy alta. Esta perla puede modificarse con sustrato o ligando mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como mediante la adición de sustrato biotilado o mediante acoplamiento covalente.

Alternativamente, un ácido nucleico biotinilado puede estar acoplado a avidina o estreptavidina formando un complejo con una macromolécula proteica, tal como tiroglobulina (669 kDa) o ferritina (440 kDa). Este complejo puede modificarse con sustrato o ligando, por ejemplo, mediante el acoplamiento covalente al grupo amino  $\epsilon$  de las lisinas o a través de una interacción no covalente tal como biotina-avidina. El sustrato puede estar presente en forma  
 5 no fijada al elemento genético, pero conteniendo una «etiqueta» inactiva que requiere otra etapa para activarla, tal como la fotoactivación (p. ej., de un análogo de biotina «enjaulado», (Sundberg et al., 1995; Pirrung y Huang, 1996)). El catalizador a seleccionar convierte entonces el sustrato en producto. A continuación, la «etiqueta» podría activarse y el sustrato y/o el producto «etiquetado» quedar unido mediante una molécula fijadora de la etiqueta (p. ej., avidina o estreptavidina) formando un complejo con el ácido nucleico. La proporción de sustrato por producto  
 10 adherido al ácido nucleico mediante la «etiqueta» informará, por lo tanto, de la proporción de sustrato y de producto en la solución.

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 sin fijar al elemento genético, pero tiene una «etiqueta» molecular (por ejemplo, biotina, DIG o DNP). Cuando el catalizador a  
 15 seleccionar convierte el sustrato en producto, el producto conserva la «etiqueta» y es entonces capturado en la microcápsula mediante el anticuerpo específico contra el producto. De este modo, el elemento genético sólo se queda asociado a la «etiqueta» cuando codifica o produce una enzima capaz de convertir el sustrato en producto.

Cuando se paran todas las reacciones y se combinan las microcápsulas, se puede enriquecer en los elementos genéticos que codifican las enzimas activas mediante un anticuerpo u otra molécula que se fija, o que reacciona  
 20 específicamente, con la «etiqueta». Aunque tanto el sustrato como el producto tienen la etiqueta molecular, sólo se copurificarán los elementos genéticos que codifican el producto génico activo.

En la presente memoria se utiliza la terminología «aislar», «clasificar» y «seleccionar», así como las variaciones de la misma. El aislamiento, de acuerdo con la presente descripción, se refiere al proceso de separar una entidad de una población heterogénea, por ejemplo, una mezcla, de tal forma que está libre de al menos una sustancia con la  
 25 cual está asociada antes del proceso de aislamiento. En una realización preferida, el aislamiento se refiere a la purificación de una entidad esencialmente a homogeneidad. La clasificación de una entidad se refiere al proceso de aislar preferiblemente las entidades deseadas en lugar de las entidades no deseadas. Dado que se refieren al aislamiento de las entidades deseadas, la terminología «aislamiento» y «clasificación» es equivalente. El procedimiento de la presente descripción permite clasificar los elementos genéticos deseados a partir de conjuntos  
 30 (colecciones o repertorios) de elementos genéticos que contienen el elemento genético deseado. La selección se utiliza para referirse al proceso (incluido el proceso de clasificación) de aislar una entidad de acuerdo a una propiedad particular de la misma.

En una aplicación muy preferida, el procedimiento de la presente descripción es útil para clasificar genotecas de elementos genéticos. Por consiguiente, la descripción da a conocer un procedimiento de acuerdo con los aspectos  
 35 precedentes de la descripción, en donde los elementos genéticos se aíslan de una genoteca de elementos genéticos que codifica un repertorio de productos génicos. En la presente memoria, la terminología «genoteca», «repertorio», «colección» y «conjunto» se utilizan de acuerdo con su significado habitual en la técnica, de tal forma que una genoteca de elementos genéticos codifica un repertorio de productos génicos. En general, las genotecas se construyen a partir de conjuntos de elementos genéticos y tienen propiedades que facilitan la clasificación.

La selección inicial de un elemento genético de una genoteca de elementos genéticos utilizando la presente descripción requerirá, en la mayoría de los casos, escrutar un gran número de elementos genéticos diferentes. Las genotecas de elementos genéticos pueden crearse de diferentes modos, entre ellos los que vienen a continuación.

Se pueden clonar conjuntos de elementos genéticos de ADN genómico o ADNc que se producen de forma natural (Sambrook et al., 1989); por ejemplo, las genotecas de anticuerpos en fagos, construidas mediante repertorios de  
 45 amplificación por PCR de genes de anticuerpos de donantes inmunizados o sin inmunizar, han resultado ser fuentes muy eficaces de fragmentos de anticuerpos funcionales (Winter et al., 1994; Hoogenboom, 1997). También se pueden construir genotecas mediante la codificación de todos los genes (véase por ejemplo Smith, 1985; Parmley y Smith, 1988) o parte de los genes (véase por ejemplo Lowman et al., 1991) o conjuntos de genes (véase por ejemplo Nissim et al., 1994) mediante un oligonucleótido sintético aleatorizado o modificado. También se pueden  
 50 fabricar genotecas mediante la introducción de mutaciones en un elemento genético o conjunto de elementos genéticos «aleatoriamente» mediante una serie de técnicas *in vivo*, entre ellas, el uso de «cepas mutadoras» de bacterias tales como *E. coli mutD5* (Liao et al., 1986; Yamagashi et al, 1990; Low et al, 1996); uso del sistema de linfocitos B para hipermutación de anticuerpos (Yelamos et al., 1995). Las mutaciones aleatorias se pueden introducir también *in vivo* e *in vitro* mediante mutágenos químicos, o mediante ionización o irradiación UV (véase  
 55 Friedberg et al., 1995), o mediante la incorporación de análogos mutagénicos de las bases (Freese, 1959, Zaccolo et al., 1996). También se pueden introducir *in vitro* mutaciones «aleatorias» en los genes durante la polimerización, por ejemplo, mediante polimerasas propensas a errores (Leung et al., 1989).

Se puede introducir más diversificación mediante recombinación homóloga bien *in vivo* (véase Kowalczykowski et

al., 1994) o *in vitro* (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b).

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto más de la presente descripción, se da a conocer un procedimiento de evolución *in vitro* que comprende las etapas de:

- 5 (a) seleccionar uno o más elementos genéticos de una genoteca de elementos genéticos de acuerdo con la presente invención;
- (b) mutar el elemento o elementos genéticos seleccionados para generar otra genoteca de elementos genéticos que codifican un repertorio de productos génicos; y
- (c) repetir iterativamente las etapas (a) y (b) para obtener un producto génico con una actividad mejorada.

Las mutaciones pueden introducirse en el elemento o elementos genéticos tal y como presentó más arriba.

- 10 Los elementos genéticos de acuerdo con la descripción codifican ventajosamente enzimas, preferiblemente de interés farmacológico o industrial, activadores o inhibidores, especialmente de sistemas biológicos, tales como mecanismos de transducción de señales celulares, anticuerpos o fragmentos de los mismos, otros agentes de fijación adecuados para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la descripción permite identificar y aislar productos útiles para la clínica o la industria. En otro aspecto de la descripción
- 15 se da a conocer un producto que se aísla mediante el procedimiento de la descripción.

- 20 Es deseable la selección de las condiciones de encapsulación adecuadas. Según la complejidad y el tamaño de la genoteca a escrutar, podría resultar beneficioso iniciar el procedimiento de encapsulación de tal forma que se encapsule por microcápsula 1 o menos de 1 elemento genético. Esto proporcionará el mayor poder de resolución. Sin embargo, cuando la genoteca es más grande y/o más compleja, esto puede ser impracticable; podría resultar preferible la encapsulación de varios elementos genéticos juntos y basarse en la aplicación repetida del procedimiento de la descripción para conseguir la clasificación de la actividad deseada. Puede utilizarse una combinación de procedimientos de encapsulación para obtener el enriquecimiento deseado.

- 25 Los estudios teóricos indican que cuanto mayor es el número de variantes de elementos genéticos creado, mayor es la probabilidad de que se cree una molécula con las propiedades deseadas (véase Perelson y Oster, 1979 para una descripción de cómo se aplica esto a los repertorios de anticuerpos). Recientemente, también se ha confirmado de forma práctica que los repertorios de anticuerpos en fagos más grandes dan lugar de hecho a más anticuerpos con mejor afinidad de fijación que los repertorios más pequeños (Griffiths et al., 1994). Para asegurar que se generan variantes raras y que, por lo tanto, se podrán llegar a seleccionar, es deseable que la genoteca tenga un gran tamaño. Así pues, resulta beneficioso el uso de microcápsulas óptimamente pequeñas.

- 30 El repertorio más grande creado hasta la fecha con procedimientos que requieren una etapa *in vivo* (sistemas de exposición en fagos y Lacl) ha sido una genoteca de péptidos de  $1,6 \times 10^{11}$  clones de fagos que requirió la fermentación de 15 l de bacterias (Fisch et al., 1996). A menudo, los experimentos SELEX se llevan a cabo sobre cantidades muy grandes de variantes (hasta  $10^{15}$ ).

- 35 Mediante la presente descripción, con un diámetro de microcápsulas preferido de 2,6  $\mu\text{m}$  se puede seleccionar un tamaño de repertorio de al menos  $10^{11}$  con una fase acuosa de 1 ml en una emulsión de 20 ml.

- 40 Además de los elementos genéticos descritos más arriba, las microcápsulas de acuerdo con la descripción comprenderán adicionalmente los componentes requeridos para que tenga lugar el procedimiento de clasificación. Otros componentes del sistema comprenderán, por ejemplo, los necesarios para la transcripción y/o traducción del elemento genético. Éstos se seleccionan por los requisitos de un sistema específico a partir de lo siguiente; un tampón adecuado, un sistema de transcripción/replicación *in vitro* y/o un sistema de traducción *in vitro* que contiene 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.

- 45 Un tampón adecuado será uno en el cual todos los componentes deseados del sistema biológico estén activos y, por lo tanto, dependerá de los requisitos de cada sistema de reacción específico. Los tampones adecuados para las reacciones biológicas y/o químicas se conocen en la técnica y las recetas se dan a conocer en varios textos de laboratorio, tal como Sambrook et al, 1989.

- 50 El sistema de traducción *in vitro* normalmente comprenderá un extracto celular, típicamente de bacterias (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, de Promega), entre ellos algunos que permitirán la transcripción/traducción acopladas (todos los sistemas bacterianos y los reticulocitos y los sistemas de extracto de germen de trigo TNT<sup>TM</sup> de Promega). La mezcla de aminoácidos utilizada puede incluir los aminoácidos sintéticos, si se desea, para incrementar el número posible o la variedad de

proteínas producidas en la genoteca. Esto puede llevarse a cabo cargando los ARNt con aminoácidos artificiales y utilizando los ARNt para la traducción *in vitro* de las proteínas que hay que seleccionar (Eilman et al., 1991; Benner, 1994; Mendel et al., 1995).

5 Después de cada ronda de selección, el enriquecimiento del conjunto de elementos genéticos en los que codifican las moléculas de interés puede analizarse mediante reacciones de transcripción/replicación *in vitro* no compartimentadas o de transcripción-traducción acopladas. El conjunto seleccionado se clona en un vector plasmídico adecuado y la proteína recombinante o el ARN se sintetiza a partir de los clones individuales para purificación y análisis adicionales.

10 Además, la descripción se refiere a un procedimiento para producir un producto génico, una vez que un elemento genético que codifica el producto génico se ha clasificado mediante el procedimiento de la descripción. Claramente, el elemento genético en sí mismo se puede expresar directamente mediante medios convencionales para producir el producto génico. Sin embargo, se pueden emplear 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 expresarla a partir de éste.

15 La descripción también describe el uso de técnicas de escrutinio convencionales para identificar los compuestos que son capaces de interactuar con los productos génicos identificados mediante el primer aspecto de la descripción. En las realizaciones preferidas, el producto génico que codifica el ácido nucleico se incorpora en un vector, y se introduce en las células hospedadoras adecuadas para producir las líneas celulares transformadas que expresan el producto génico. A continuación, las líneas celulares resultantes pueden producirse para el análisis cualitativo y/o  
20 cuantitativo reproducible del o de los efectos de los posibles fármacos que afectan a la función del producto génico. Así pues, pueden emplearse células que expresan el producto génico para identificar compuestos, particularmente compuestos de masa molecular pequeña, que modulan la función del producto génico. Así pues, las células hospedadoras que expresan el producto génico son útiles para el escrutinio de fármacos y es otro objeto de la presente descripción dar a conocer un procedimiento para identificar compuestos que modulen la actividad del  
25 producto génico, en donde dicho procedimiento comprende la exposición de las células que contienen ADN heterólogo que codifica el producto génico, en donde dichas células producen el producto génico funcional, a al menos un compuesto o mezcla de compuestos o señal cuya capacidad para modular la actividad de dicho producto génico se pretende determinar y, después, monitorizar los cambios que dicha modulación ocasiona en dichas células. Tal ensayo permite identificar moduladores, tal como agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos, del  
30 producto génico. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un compuesto o señal que modula la actividad del producto génico se refiere a un compuesto que altera la actividad el producto génico de tal manera que la actividad del producto génico es diferente en presencia del compuesto o señal (en comparación con la ausencia de dicho compuesto o señal).

35 Se pueden diseñar ensayos de escrutinio con células para construir líneas celulares en las cuales la expresión de una proteína indicadora, a saber, una proteína que se puede analizar con facilidad, tal como la  $\beta$ -galactosidasa, la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) o la luciferasa, depende del producto génico. Tal ensayo permite detectar compuestos que directamente modulan la actividad del producto génico, tal como compuestos que antagonizan con el producto génico, o compuestos que inhiben o potencian otras funciones celulares requeridas para la actividad del producto génico.

40 La presente descripción también da a conocer un procedimiento para afectar exógenamente los procesos dependientes del producto génico que se producen en las células. Las células hospedadoras, p. ej., células de mamífero, productoras del producto génico recombinante se pueden poner en contacto con un compuesto problema y luego se pueden evaluar el efecto o efectos moduladores con la comparación de la respuesta mediada por el producto génico en presencia y ausencia del compuesto problema, o relacionando la respuesta mediada por el  
45 producto génico de las células problema, o de las células de control (a saber, células que no expresan el producto génico), con la presencia del compuesto.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para optimizar un proceso de producción en el que interviene al menos una etapa que está facilitada por un polipéptido. Por ejemplo, la etapa puede ser una etapa catalítica, que está facilitada por una enzima. Así pues, la descripción da a conocer un procedimiento para preparar  
50 un compuesto o compuestos que comprenden las etapas de:

(a) proporcionar un protocolo de síntesis, en donde al menos una etapa está facilitada por un polipéptido;

(b) preparar elementos genéticos que codifican variantes del polipéptido que facilita esta etapa;

(c) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas;

55 (d) expresar los elementos genéticos para producir sus correspondientes productos génicos dentro de las microcápsulas;

- (e) clasificar los elementos genéticos que producen el producto o productos génicos que tienen la actividad deseada; y
- (f) preparar el compuesto o compuestos utilizando el producto génico polipeptídico identificado en (e) para facilitar la etapa de síntesis pertinente.

5 Por medio de la descripción, las enzimas implicadas en la preparación de un compuesto pueden optimizarse mediante la selección de una actividad óptima. El procedimiento implica la preparación de variantes del polipéptido a escrutir, que equivale a una genoteca de polipéptidos tal y como se menciona en la presente memoria. Las variantes pueden prepararse de la misma manera que las genotecas explicadas en otras partes de la presente memoria.

10 (B) Procedimientos de selección

El sistema puede configurarse para seleccionar ARN, ADN o moléculas del producto proteico del gen con actividad catalítica, reguladora o fijadora.

(i) Selección por afinidad

15 En el caso de la selección de un producto génico con afinidad por un ligando específico, el elemento genético puede estar unido al producto génico en la microcápsula a través del ligando. Por lo tanto, sólo los productos génicos con afinidad por el ligando se fijarán al propio elemento genético y, por lo tanto, en la etapa de selección sólo se conservarán los elementos genéticos que producen el producto activo. En esta realización, el elemento genético comprenderá, por lo tanto, un ácido nucleico que codifica el producto génico conectado a un ligando del producto génico.

20 En esta realización, todos los productos génicos a seleccionar contienen un posible dominio de fijación, que es lo que se seleccionará, y una característica común: una etiqueta. El elemento genético de cada microcápsula está físicamente conectado al ligando. Si el producto génico sintetizado a partir del elemento genético tiene afinidad por el ligando, se fijará a él y se quedará físicamente conectado al mismo elemento genético que lo codifica, dando lugar a que el elemento genético quede «etiquetado». Al final de la reacción se reúnen todas las microcápsulas, y todos  
25 los elementos genéticos y los productos génicos se agrupan en el mismo medio. Los elementos genéticos que codifican los productos génicos que muestran la fijación deseada se pueden seleccionar mediante purificación por afinidad mediante una molécula que se fija específicamente a la «etiqueta», o que reacciona específicamente con ella.

30 En una realización alternativa, los elementos genéticos se pueden clasificar basándose en que el producto génico, que se fija al ligando, simplemente oculta al ligando de, por ejemplo, otros compañeros de fijación. En este caso, el elemento genético, en vez de conservarse durante una etapa de purificación de afinidad, se puede eluir selectivamente mientras permanecen fijados otros elementos genéticos.

35 En una realización alternativa, la descripción da a conocer un procedimiento en cual, en la etapa (b), los productos génicos se fijan a los elementos genéticos que los codifican. A continuación, los productos génicos junto con los elementos genéticos unidos se clasifican como resultado de la fijación de un ligando a los productos génicos que tienen la actividad deseada. Por ejemplo, todos los productos génicos pueden contener una región invariante que se fija covalente o no covalentemente al elemento genético, y una segunda región que se diversifica para generar la actividad fijadora deseada.

40 La clasificación por afinidad depende de la presencia de dos miembros de una pareja de fijación en condiciones tales que se puede producir la fijación. Se puede usar cualquier pareja de fijación para este propósito. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología pareja de fijación se refiere a cualquier pareja de moléculas capaz de fijarse entre sí. Los ejemplos de parejas de fijación que pueden utilizarse en la presente invención incluyen un antígeno o un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de fijarse al antígeno, la pareja biotina-avidina/estreptavidina (Savage et al., 1994), un polipéptido de fijación dependiente de calcio y un ligando del mismo (p. ej., calmodulina y  
45 péptido de fijación a calmodulina (Stofko et al., 1992; Motingiani et al., 1996)), parejas de polipéptidos que se ensamblan para formar una cremallera de leucinas (Triplet et al., 1996), histidinas (típicamente péptidos de seis histidinas) y  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  quelados (p. ej., Ni-NTA, Hochuli et al., 1987), proteínas fijadoras de ARN y fijadoras de ADN (Klug, 1995), entre ellas las que contienen motivos de dedo de Zn (Klug y Schwabe, 1995) y ADN metiltransferasas (Anderson, 1993) y sus sitios de fijación de ácido nucleico.

50 (ii) Catálisis

Cuando la selección es por 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 catalizador, el producto génico catalizará la conversión del sustrato en el producto. Por consiguiente, al final de la reacción, el elemento genético se une físicamente al producto de la reacción catalizada. Cuando se combinan las microcápsulas y se

agrupan los reactivos, se pueden enriquecer en los elementos genéticos que codifican las moléculas catalíticas mediante la selección de cualquier propiedad específica del producto (figura 1).

Por ejemplo, el enriquecimiento puede ser mediante purificación por afinidad utilizando una molécula (p. ej., un anticuerpo) que se fija específicamente al producto. De igual forma, el producto génico puede tener el efecto de  
 5 modificar un componente de ácido nucleico del elemento genético, por ejemplo mediante metilación (o desmetilación) o mutación del ácido nucleico, convirtiéndolo en resistente al ataque de las nucleasas, tal como las endonucleasas de restricción, o sensible a dicho ataque.

Alternativamente, la selección puede realizarse indirectamente al acoplar una primera reacción a las reacciones posteriores que tienen lugar en la misma microcápsula. Hay dos modos generales de poder realizar esto. Primero, el  
 10 producto de la primera reacción se podría hacer reaccionar con, o fijarse a, una molécula que no reacciona con el sustrato de la primera reacción. Una segunda reacción acoplada sólo tendrá lugar en presencia del producto de la primera reacción. Entonces se puede purificar un elemento genético activo mediante la selección de las propiedades del producto de la segunda reacción.

Alternativamente, el producto de la reacción a seleccionar puede ser el sustrato o el cofactor de una segunda  
 15 reacción catalizada por enzimas. La enzima que cataliza la segunda reacción se puede traducir *in situ* en las microcápsulas o se puede incorporar en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. La enzima acoplada sólo generará un producto seleccionable cuando haya tenido lugar la primera reacción.

Este concepto de acoplamiento puede elaborarse para incorporar muchas enzimas, en donde cada una utiliza como sustrato el producto de la reacción anterior. Esto permite la selección de las enzimas que no reaccionarán con un  
 20 sustrato inmovilizado. También puede diseñarse para incrementar la sensibilidad mediante la amplificación de la señal si un producto de una reacción es un catalizador o un cofactor de una segunda reacción o serie de reacciones que llevan a un producto que se puede seleccionar (por ejemplo, véase Johannsson y Bates, 1988; Johannsson, 1991). Además, un sistema de cascada enzimática puede estar basado en la producción de un activador para una enzima o en la destrucción de un inhibidor enzimático (véase Mize et al., 1989). El acoplamiento también tiene la  
 25 ventaja de poder utilizar un sistema de selección común para un grupo completo de enzimas que generan el mismo producto y garantiza la selección de transformaciones químicas complicadas que no pueden realizarse en una única etapa.

Así pues, tal procedimiento de acoplamiento permite la evolución de nuevas «vías metabólicas» *in vitro* de una forma escalonada, seleccionando y mejorando primero una etapa y luego la siguiente. La estrategia de selección se  
 30 basa en el producto final de la vía, por lo que todas las etapas anteriores pueden evolucionar independientemente o secuencialmente sin iniciar un nuevo sistema de selección para cada etapa de la reacción.

Expresado de una manera alternativa, se da a conocer un procedimiento 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 dar sus respectivos productos génicos;
- 35 (2) permitir que los productos génicos catalicen la conversión de un sustrato en un producto, que se podría o no se podría seleccionar directamente, de acuerdo con la actividad deseada;
- (3) opcionalmente, acoplar la primera reacción a una o más reacciones posteriores, en donde cada reacción está modulada por el producto de las reacciones anteriores, y conduce a la creación de un producto final que se puede seleccionar;
- 40 (4) conectar el producto que se puede seleccionar a los elementos genéticos de la catálisis mediante:
  - (a) acoplando un sustrato a los elementos genéticos de tal manera que el producto permanece asociado a los elementos genéticos, o
  - (b) haciendo reaccionar o fijando el producto seleccionable a los elementos genéticos por medio de una «etiqueta» molecular adecuada unida al sustrato que permanece en el producto, o
  - 45 (c) acoplando el producto seleccionable (pero no el sustrato) a los elementos genéticos por medio de una reacción específica del producto o la interacción con el producto; y
- (5) seleccionar el producto de la catálisis, junto con el elemento genético al que está fijado, bien por medio de una reacción específica o interacción con el producto, o bien mediante purificación por afinidad con una  
 50 «etiqueta» molecular adecuada al producto de la catálisis, en donde las etapas (1) a (4) de cada elemento genético y el producto génico correspondiente está contenido dentro de una microcápsula.

(iii) Regulación

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

En el caso de la selección de una molécula reguladora que actúa como activadora o inhibidora de un proceso bioquímico, los componentes del proceso bioquímico se pueden traducir *in situ* en cada microcápsula o pueden incorporarse en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Si el elemento genético que se selecciona es para codificar un activador, la selección puede realizarse por el producto de la reacción regulada, tal y como se describe más arriba en conexión con la catálisis. Si se desea un inhibidor, la selección puede ser por una propiedad química específica del sustrato de la reacción regulada.

Así pues, se da a conocer un procedimiento para clasificar uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que muestra una actividad reguladora deseada, que comprende las etapas de:

- 10 (1) expresar los elementos genéticos para dar sus respectivos productos génicos;
- (2) permitir que los productos génicos activen o inhiban una reacción bioquímica, o secuencia de reacciones acopladas, de acuerdo con la actividad deseada, de tal modo que permita la generación o supervivencia de una molécula que se puede seleccionar;
- (3) conectar la molécula seleccionable a los elementos genéticos al
- 15 (a) conectar la molécula seleccionable, o sustrato del cual procede, a los elementos genéticos, o
- (b) hacer reaccionar o fijar el producto seleccionable a los elementos genéticos, por medio de una «etiqueta» molecular adecuada unida al sustrato que permanece en el producto, o
- (c) acoplar el producto de la catálisis (pero no el sustrato) a los elementos genéticos, por medio de una reacción específica del producto o la interacción con el producto;
- 20 (4) seleccionar el producto seleccionable, junto con el elemento genético al cual está fijado, por medio de una reacción específica o interacción con el producto seleccionable, o mediante purificación de afinidad con una «etiqueta» molecular adecuada unida al producto de la catálisis, en donde las etapas (1) a (4) de cada elemento genético y el producto génico correspondiente están contenidos dentro de una microcápsula.

#### (iv) Clasificación de las microcápsulas

25 La descripción garantiza que se clasifiquen las microcápsulas intactas allí donde esto es posible gracias al empleo de técnicas de clasificación. Las microcápsulas pueden clasificarse como tales cuando el cambio inducido por el producto génico deseado bien se produce o se manifiesta él mismo en la superficie de la microcápsula o bien es detectable desde fuera de la microcápsula. El cambio puede estar causado por la acción directa del producto génico, o ser indirecta, en donde una serie de reacciones, una o varias de las cuales implica el producto génico que tiene la actividad deseada, conduce al cambio. Por ejemplo, la microcápsula puede configurarse así de tal forma que el producto génico se exponga en su superficie y, por lo tanto, sea accesible a los reactivos. Cuando la microcápsula es una microcápsula membranosa, el producto génico puede estar dirigido, o puede hacer que una molécula se dirija, a la membrana de la microcápsula. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el empleo de una secuencia para la localización membranaria, tal como las procedentes de proteínas membranarias, que favorecerán la incorporación de una molécula fusionada o conectada a la membrana de la microcápsula. Alternativamente, cuando la microcápsula se forma mediante reparto de fases, tal como emulsiones de aceite en agua, una molécula que tiene partes que son más solubles en la fase extracapsular se distribuirá ella misma de modo que esté presente en los límites de la microcápsula.

En un aspecto preferente de la descripción, sin embargo, la clasificación de las microcápsulas se aplica a los sistemas de clasificación que se basan en un cambio en las propiedades ópticas de la microcápsula, por ejemplo características de absorción o emisión de la misma, por ejemplo la alteración de las propiedades ópticas de la microcápsula, que es resultado de una reacción que conduce a cambios en la absorbancia, luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia asociadas a la microcápsula. Todas estas propiedades están incluidas en la terminología «óptico». En tal caso, las microcápsulas pueden clasificarse mediante la clasificación activada por luminiscencia, fluorescencia o fosforescencia. En una realización muy preferida, se emplea la clasificación activada por fluorescencia para clasificar microcápsulas en las que la producción de un producto génico que tiene una actividad deseada está acompañada de la producción de una molécula fluorescente en la célula. Por ejemplo, el producto génico en sí mismo puede ser fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente tal como GFP. Alternativamente, el producto génico puede inducir o modificar la fluorescencia de otra molécula, tal como fijándola o reaccionando con ella.

#### (v) Identificación de las microcápsulas

Las microcápsulas se pueden identificar por medio de un cambio inducido por el producto génico deseado que o se

produce o se manifiesta por sí mismo en la superficie de la microcápsula o es detectable desde el exterior, tal y como está descrito en el apartado (iii) (Clasificación de las microcápsulas). Este cambio, cuando se identifica, se utiliza para desencadenar la modificación del gen dentro del compartimento. En un aspecto preferido de la descripción, la identificación de las microcápsulas se basa en un cambio de las propiedades ópticas de la microcápsula, que es resultado de una reacción que conduce a luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia dentro de la microcápsula. La modificación del gen dentro de las microcápsulas estaría desencadenado por la identificación de la luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia. Por ejemplo, la identificación de la luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia puede desencadenar el bombardeo del compartimento con fotones (u otras partículas u ondas), lo que conduce a la modificación del elemento genético. Ya se ha descrito antes un procedimiento similar para la clasificación rápida de células (Keij et al., 1994). La modificación del elemento genético puede ser el resultado, por ejemplo, de acoplar una «etiqueta» molecular, enjaulada por un grupo protector fotolábil a los elementos genéticos: el bombardeo con fotones de una longitud de onda apropiada conduce a la retirada de la jaula. Después de esto, todas las microcápsulas se reúnen y los elementos genéticos se juntan en el mismo medio. Los elementos genéticos que codifican los productos génicos que muestran la actividad deseada pueden seleccionarse mediante purificación por afinidad con una molécula que se fija específicamente a la «etiqueta», o que reacciona específicamente con ella.

(vi) Procedimiento en varias etapas

También se apreciará que, de acuerdo con la presente descripción, no es necesario para todos los procesos de transcripción/replicación y/o traducción, y selección continuar en una sola etapa, en donde todas las reacciones que tienen lugar en una microcápsula. El procedimiento de selección puede comprender dos o más etapas. Primero, la transcripción/replicación y/o traducción de cada elemento genético de una genoteca de elementos genéticos puede tener lugar en una primera microcápsula. Cada producto génico luego se queda conectado al elemento genético que lo codifica (que reside en la misma microcápsula). A continuación se rompen las microcápsulas y los elementos genéticos que van unidos a sus respectivos productos génicos se purifican opcionalmente. Alternativamente, los elementos genéticos pueden unirse a sus respectivos productos génicos mediante procedimientos que no se basan en la encapsulación. Por ejemplo, exposición en fagos (Smith G.P., 1985), exposición en polisomas (Mattheakkis et al., 1994), fusión de ARN-péptido (Roberts y Szostak, 1997) o fusión de péptidos al represor de *lac* (Cull et al., 1992).

En la segunda etapa del procedimiento, cada elemento genético purificado unido a su producto génico se coloca en una segunda microcápsula que contiene los componentes de la reacción a seleccionar. Entonces se inicia esta reacción. Después de que las reacciones hayan terminado, las microcápsulas se rompen de nuevo y se seleccionan los elementos genéticos modificados. En el caso de reacciones de varias etapas complicadas en las que están implicados muchos componentes individuales y etapas de reacción, se pueden interponer una o más etapas entre la etapa inicial de creación y la conexión del producto génico al elemento genético, y la etapa final de generar en el elemento genético un cambio que se puede seleccionar.

(vii) Selección por la activación *in situ* de la expresión del gen indicador

El sistema puede configurarse de tal forma que la actividad fijadora, catalítica o reguladora deseada que codifica un elemento genético conduzca, directa o indirectamente, a la activación de la expresión de un «gen indicador» que está presente en todas las microcápsulas. Sólo los productos génicos con la actividad deseada activan la expresión del gen indicador. La actividad que es resultado de la expresión del gen indicador permite seleccionar el elemento genético (o del compartimento que lo contiene) mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, la activación del gen indicador puede ser resultado de una actividad fijadora del producto génico de una manera análoga al «sistema de doble híbrido» (Fields y Song, 1989). La activación podría también ser el resultado del producto de una reacción catalizada por un producto génico deseable. Por ejemplo, el producto de reacción podría ser un inductor transcripcional del gen indicador. Por ejemplo, podría utilizarse la arabinosa para inducir la transcripción desde el promotor de *araBAD*. La actividad del producto génico deseable podría también dar lugar a la modificación de un factor de transcripción, que da lugar a la expresión del gen indicador. Por ejemplo, si el producto génico deseado es una cinasa o una fosfatasa, la fosforilación o la desfosforilación de un factor de transcripción podría conducir a la activación de la expresión del gen indicador.

(viii) Amplificación

De acuerdo con otro aspecto más de la presente descripción, el procedimiento comprende la etapa adicional de amplificar los elementos genéticos. La amplificación selectiva puede utilizarse como medio con el que incrementar la cantidad de elementos genéticos que codifican el producto génico deseado.

En todas las configuraciones anteriores, el material genético comprendido en los elementos genéticos puede amplificarse y el proceso repetirse en etapas reiterativas. La amplificación puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki et al, 1988) o mediante una serie de técnicas diferentes de amplificación génica, entre ellas,

amplificación con la replicasa de Q $\beta$  (Cahill, Foster y Mahan, 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev, Kumasov y Spirin, 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegren et al, 1988; Barany, 1991); el sistema de replicación de secuencias automantenido (Fahy, Kwoh y Gingeras, 1991) y la amplificación por desplazamiento de hebra (Walker et al., 1992).

5 (ix) Compartimentación

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se da a conocer un procedimiento para compartimentar un elemento genético y expresar el elemento genético para formar su producto génico dentro del compartimento, que comprende las etapas de:

- 10 (a) formar una solución acuosa que comprende el elemento genético y los componentes necesarios para expresarlo para formar su producto génico;
- (b) microencapsular la solución para formar microcápsula independientes que comprenden el elemento genético; y
- (c) exponer la microcápsula a las condiciones adecuadas para llevar a cabo la expresión del elemento genético para que se forme su producto génico.

- 15 Las técnicas de microencapsulación adecuadas se describen en detalle en la descripción general que se acaba de exponer.

Preferiblemente, una genoteca de elementos genéticos que codifica un repertorio de productos génicos se encapsula mediante el procedimiento presentado más arriba, y los elementos genéticos se expresan para producir sus correspondientes productos génicos. En una realización muy preferida, la microencapsulación se logra mediante la formación de una emulsión de agua en aceite de la solución acuosa que comprende los elementos genéticos.

20 Por consiguiente, la descripción también da a conocer una microcápsula que se puede obtener mediante el procedimiento presentado más arriba.

Los diferentes aspectos y realizaciones de la presente invención y de la descripción se ilustran en los ejemplos siguientes.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1: La producción de microcápsulas acuosas de aproximadamente 2  $\mu$ m en un sistema de emulsión de agua en aceite.

Las microcápsulas dentro del intervalo de tamaño preferido de la presente invención y descripción se pueden generar con un sistema de emulsión de aceite en agua.

- 30 Se utiliza en la presente memoria aceite mineral ligero transparente (Sigma; M-3516) como la fase continua y se establece la emulsión mediante los emulsionantes monooleato de sorbitán (Span 80, Fluka; 85548) y monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80, Sigma Ultra; P-8074) y en algunos casos también con desoxicolato de sodio al 0,5% p/v (Fluka; 30970).

- 35 La fase oleosa se prepara nueva disolviendo Span 80 (Fluka) al 4,5% (v/v) en aceite mineral (Sigma, n.º M-5904) y posteriormente Tween 80 (Sigma Ultra, n.º P-8074) al 0,5% (v/v). Se añaden poco a poco las mezclas de reacción *in vitro* enfriadas en hielo (50  $\mu$ l en alícuotas de 10  $\mu$ l durante 2 minutos) a 0,95 ml de la fase oleosa enfriada en hielo en un vial Costal Biofreeze de 5 ml (n.º 2051) mientras que se agita con una barra magnética (8 x 3 mm con un anillo de pivote; Scientific Industries International, Loughborough, UK). La agitación (a 1150 rpm) prosigue otro minuto más en hielo. En algunas emulsiones, la fase acuosa se complementa con un tensioactivo aniónico, p. ej, desoxicolato de sodio, colato de sodio, glicocolato de sodio y taurocolato de sodio, típicamente a 0,5% (p/v).

40 Cuando se indica, la emulsión se homogeneiza adicionalmente con un dispersador Ultra-Turrax T25 (IKA) equipado con una herramienta dispersadora con un diámetro de 8 mm a 8000, 9000 o 13.500 rpm durante 1 minuto, o a 20.000 rpm durante 1 o 5 minutos, en hielo. Esto reduce el tamaño de la microcápsula.

- 45 Las reacciones se pueden detener y la emulsión se puede romper tal y como se indica en los ejemplos individuales, mediante centrifugación a 3000 g durante 5 minutos y retirando la fase oleosa, lo que deja la emulsión concentrada al fondo del vial. Se añaden el tampón de parada (típicamente, 0,2 ml de ARN de levadura a 25  $\mu$ g/ml en tampón W+B, NaCl a 1 M, Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 7,4) y 2 ml de dietiléter saturado de agua y la mezcla se mezcla por agitación vorticial, se centrifuga brevemente y se retira la fase de éter. La fase acuosa se lava con éter y se seca (5 minutos en una Speedvac a temperatura ambiente).

- 50 Se determina la distribución de los tamaños de las gotitas acuosas en las emulsiones mediante difracción con láser

mediante un analizador de tamaño de las partículas Coulter LS230. Una alícuota de la emulsión, recién diluida (1:10) en aceite mineral se añade a la cámara microvolumétrica que contiene el aceite mineral agitado. Los resultados se analizan con el modelo óptico Mie que lleva el instrumento y el uso de los índices de refracción de 1,468 para el aceite mineral y de 1,350 para la fase acuosa. La distribución de los tamaños de las gotitas acuosas en la emulsión se muestra en la figura 2. La adición del desoxicolato de sodio no altera significativamente la distribución de los tamaños.

Ejemplo 2: Reacciones de transcripción eficientes *in vitro* realizadas en las microcápsulas acuosas de una emulsión de agua en aceite

Para producir ARN a partir de ADN dentro de cada microcápsula, se debe transcribir con eficacia la única molécula de ADN presente dentro de cada microcápsula acuosa del sistema. En la presente memoria, se demuestra que hay transcripción *in vitro* dentro de las microcápsulas.

El núcleo catalítico del intrón autoajustable de *Tetrahymena* es una ribozima muy estudiada que puede catalizar muy diversas reacciones de transferencia de fosfoésteres (Sag et al., 1986; Sag y Czech, 1986; Sag y Czech, 1986). Por ejemplo, un intrón modificado de *Tetrahymena* que carece de la horquilla P1 del extremo 5', y que carece de las horquillas P9.1 y P9.2 en 3' puede funcionar como una ARN ligasa, al ajustar con eficacia dos o más oligonucleótidos alineados con una hebra de plantilla (Green y Szostak, 1992).

El ADN que codifica la ribozima de *Tetrahymena* descrita más arriba se amplifica por PCR con los cebadores P2T7Ba (que se hibrida en la región de la horquilla P2 y le añade un promotor de la ARN polimerasa de T7) y P9Fo (que se hibrida en la región de la horquilla P9). Esto crea un fragmento de ADN de 331 pares de bases que lleva el promotor de la ARN polimerasa de T7. Este fragmento se purifica directamente con las Wizard PCR Preps (Promega) y se utiliza como plantilla para una reacción de transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa de T7.

La transcripción *in vitro* se analiza durante un intervalo inicial de 10 minutos durante el cual la velocidad de reacción es esencialmente lineal (Chamberlin y Ring, 1973). Las condiciones de reacción para la transcripción son como se describe en Wyatt et al., 1991.

Se utiliza la incorporación de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-UTP para analizar el progreso de la reacción.

Se monta una reacción de transcripción en un volumen de 200  $\mu$ l y se divide en 2 alícuotas, cada una con  $3 \times 10^{11}$  moléculas de ADN (5 nM). Una alícuota de 100  $\mu$ l se añade a 2 ml de aceite mineral ligero transparente de Sigma que contiene Span 80 al 4,5% y Tween 80 al 0,5%, y se homogeneiza durante 5 minutos con un dispersador Ultra-Turrax T25 a 20.000 rpm como en el ejemplo 1. Basándose en el volumen medio de las microcápsulas en estas emulsiones ( $2,8 \times 10^{-19}$  m<sup>3</sup> para una microcápsula con un diámetro de 0,81  $\mu$ m), la reacción de 100  $\mu$ l se dividiría en  $3,6 \times 10^{11}$  microcápsulas. Por consiguiente, debe haber una media de 1 molécula de ADN por microcápsula.

Ambas alícuotas se incuban en un baño María a 37 °C. Se retiran muestras de 0,5 ml de la emulsión antes del comienzo de la incubación y transcurridos 10 minutos, y se colocan en hielo. En el mismo momento se retiran muestras similares de 25  $\mu$ l de las reacciones de control que no están emulsionadas. Se rompen las emulsiones y se paran las reacciones con 0,5 ml de EDTA (50 mM) y 2 ml de dietiléter saturado de agua, tal y como se describe en el ejemplo 1. Luego le se añaden 100  $\mu$ l de ADN de espermatozoides de salmón (500  $\mu$ g/ml) en EDTA a 20 mM. Después se retiran tres alícuotas de 100  $\mu$ l de las emulsiones y de los controles, y se analiza el ARN marcado mediante precipitación con TCA y recuento de centelleo.

La velocidad de la transcripción se toma como el incremento de cpm que se pueden percibir en el ácido durante la incubación de 10 minutos a 37 °C. En la reacción de control que no se emulsionó hay 442.000 cpm de material perceptible en ácido en comparación con las 147.000 cpm en la emulsión. Por consiguiente, la velocidad de transcripción en la emulsión es el 33% de la encontrada en la reacción de control no emulsionada.

Por consiguiente, este procedimiento muestra que el ARN puede sintetizarse con eficacia mediante la ARN polimerasa de T7 en las microcápsulas acuosas de una emulsión de agua en aceite.

Ejemplo 3: Eficacia de las reacciones de transcripción/traducción acopladas *in vitro* que se llevan a cabo en las microcápsulas acuosas de una emulsión de agua en aceite.

Para sintetizar las proteínas con el procedimiento de la presente descripción, la traducción debe ser activa en las microcápsulas acuosas de la emulsión de agua en aceite descrita en la presente memoria.

Aquí se muestra cómo una proteína (la dihidrofolato reductasa de *E. coli*) se puede producir con eficacia a partir del ADN de las microcápsulas acuosas de un sistema de emulsión de agua en aceite con un sistema de transcripción/traducción acopladas.

El gen *folA* de *E. coli* que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) se amplifica por PCR con los oligonucleótidos

EDHFRFo y EDHFRBa. Luego se clona este ADN en el vector pGEM-4Z (Promega) digerido con *HindIII* y *KpnI* cadena abajo del promotor de *lac* y del promotor de la ARN polimerasa de T7. El oligonucleótido EDHFRBa añade el sitio de inicio de la traducción eficaz del gen *10* del fago T7 por delante del codón de inicio de la DHFR.

5 La secuenciación del ADN identifica un clon que tiene la secuencia nucleotídica correcta. Las bacterias transformadas con este clon (pGEM-foIA) se encuentra que sobreexpresan la DHFR activa (a partir del promotor de *lac*) cuando se induce con IPTG.

10 A continuación, el plásmido pGEM-foIA se amplifica por PCR con los cebadores LMB2 y LMB3 en las condiciones descritas más arriba para crear un fragmento de ADN de 649 pb que lleva el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen *10* del fago T7 y el gen *foIA*. Este fragmento de PCR se purifica directamente con las Wizard PCR Preps (Promega) y se utiliza para programar un sistema procariota de transcripción/traducción acopladas *in vitro* diseñado para plantillas lineales (Lesley, Brow y Burgess, 1991).

Se utiliza una preparación comercial de este sistema (Sistema de extracto S30 de *E.coli* para plantillas lineales; Promega) complementado con ARN polimerasa de T7.

15 Se monta una reacción de traducción de 300  $\mu$ l en hielo que contiene  $3 \times 10^{12}$  moléculas de ADN. La ARN polimerasa de T7 ( $10^4$  unidades) se añade para conducir la transcripción y la proteína traducida se marca mediante la adición de [ $^{35}$ S]-metionina. Una alícuota de 150  $\mu$ l de esta reacción se añade a 2,85 ml de aceite mineral ligero transparente de Sigma que contiene Span 80 al 4,5% y Tween 80 al 0,5%, y se homogeneiza durante 1 minuto con un dispersador Ultra-Turrax T25 a 20.000 rpm, como en el ejemplo 1. La otra alícuota no se emulsiona.

20 Basándose en el volumen medio de las microcápsulas en las emulsiones ( $1,1 \times 10^{-18} \text{ m}^3$  para una microcápsula con un diámetro de 1,29  $\mu$ m), la reacción de 150  $\mu$ l se dividiría en  $1,3 \times 10^{11}$  microcápsulas). Así pues, debe haber aproximadamente 11 moléculas de ADN por microcápsula.

25 Se retiran cuatro alícuotas de 0,5 ml de la emulsión de la mezcla de reacción. Inmediatamente se coloca una alícuota en hielo y las otras tres se incuban en un baño María a 25 °C durante 2 horas antes de colocarlas en hielo. También se retiran cuatro muestras de 25  $\mu$ l de la mezcla de reacción sin emulsionar; una se coloca inmediatamente en hielo y las otras tres se incuban en un baño María a 25 °C durante 2 horas y luego se colocan en hielo.

30 Las emulsiones se centrifugan en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se retira el aceite mineral, lo que deja la emulsión concentrada (pero aún intacta) en el fondo del tubo. Después de volver a centrifugar brevemente y retirar cualquier resto de aceite mineral, se rompe la emulsión y se para la traducción con la adición de 100  $\mu$ l de agua que contiene puromicina a 125  $\mu$ g/ml, y 1 ml de dietiléter saturado de agua. Esta mezcla se mezcla por agitación vorticial y se vuelve a centrifugar en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C. A continuación se retira el éter y el aceite disuelto mediante aspiración y se repite la extracción con 1 ml más de éter. Se retiran los restos de éter por centrifugación durante 5 minutos en una Speedvac a temperatura ambiente.

35 También se añaden 100  $\mu$ l de agua con puromicina a 125  $\mu$ g/ml a las reacciones de control sin emulsionar de 25  $\mu$ l. Luego se precipitan con acetona 25  $\mu$ l de cada una de las muestras y se migran en un gel de SDS-PAGE al 20% de acuerdo con la instrucciones dadas por los fabricantes del sistema de transcripción/traducción *in vitro* (Promega). Se seca el gel y se escanea con un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Se observa una banda intensa única con la masa molecular esperada de la DHFR (18 kDa) en las reacciones realizadas tanto en emulsión como en los controles. Esta banda se cuantifica con exactitud.

40 En las reacciones emulsionadas, la media del área bajo el pico de 18 kDa es de 15.073 unidades, mientras que la media del área bajo el mismo pico en las reacciones de control sin emulsionar es de 18.990 unidades. Por tanto, en las reacciones emulsionadas, la cantidad de proteína DHFR se calcula que es el 79% de la encontrada en las reacciones de control sin emulsionar. Por lo tanto, esto indica que el sistema de transcripción/traducción es funcional en el sistema de emulsión de agua en aceite de la presente descripción.

45 Ejemplo 4: La dihidrofolato reductasa sintetizada en las reacciones de transcripción/traducción acopladas *in vitro* es activa.

50 Aquí se muestra que la proteína (la dihidrofolato reductasa de *E. coli*) se puede sintetizar con eficacia en una forma catalíticamente activa mediante la transcripción/traducción acopladas del gen *foIA* en las microcápsulas acuosas de un sistema de emulsión de agua en aceite. En este ensayo se utiliza una emulsión que comprende microcápsulas por debajo del tamaño óptimo; la actividad de la DHFR se muestra que es más alta en las microcápsulas con los tamaños más grandes.

Se montan en hielo reacciones de traducción de 175  $\mu$ l (sin marcar) que contienen bien  $2 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{12}$  o  $1,8 \times 10^{12}$  moléculas del ADN plantilla del *foIA* utilizado en el ejemplo 3, o ningún ADN. Para promover la transcripción se añade a cada reacción la ARN polimerasa de T7 ( $6 \times 10^3$  unidades).

- Una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de cada reacción se añade a 1,9 ml de aceite mineral de Sigma que contiene Span 80 a 4,5% y Tween 80 al 0,5%, y se homogeneiza durante 1 minuto o 5 minutos con un homogeneizador Ultra-Turrax T25 equipado con una herramienta de dispersión con un diámetro de 8 mm, a 20.000 rpm como en el ejemplo 1.
- 5 Después de la homogeneización durante 1 minuto, el diámetro medio de las partículas (por volumen) es de 1,30  $\mu\text{m}$  (1,28  $\mu\text{m}$  de mediana). El 98% del volumen de la fase interna (acuosa) está presente en las partículas que varían de 0,63  $\mu\text{m}$  a 2,12  $\mu\text{m}$ . Después de la homogeneización durante 5 minutos, el diámetro medio de las microcápsulas (por volumen) es de 0,81  $\mu\text{m}$  (0,79  $\mu\text{m}$  de mediana) y el 98% de volumen de la fase interna (acuosa) está presente en las partículas que varían desde 0,41  $\mu\text{m}$  a 1,38  $\mu\text{m}$ .
- 10 Basándose en el volumen medio de las microcápsulas en las emulsiones de 1 minuto ( $1,1 \times 10^{-18} \text{ m}^3$  para una microcápsula con un diámetro de 1,299  $\mu\text{m}$ ), la reacción de 100  $\mu\text{l}$  se dividiría en  $8,7 \times 10^{10}$  microcápsulas. Por tanto, debe haber aproximadamente 1,3, 3,9 o 11,8 moléculas de ADN por microcápsula.
- Basándose en el volumen medio de las microcápsulas en las emulsiones de 5 minutos ( $2,8 \times 10^{-19} \text{ m}^3$  para una microcápsula con un diámetro de 0,81  $\mu\text{m}$ ), la reacción de 100  $\mu\text{l}$  se dividiría en  $3,6 \times 10^{11}$  microcápsulas. Por tanto, debe haber aproximadamente 0,3, 1,0 o 2,9 moléculas de ADN por microcápsula.
- 15 Las emulsiones, y la mezcla de reacción sin emulsionar, se incuban en un baño María a 25 °C. Inmediatamente antes del comienzo de la incubación y después de 2 horas se retiran muestras de 0,5 ml de la emulsión, y se colocan en hielo. Se retiran muestras de 25  $\mu\text{l}$  de las reacciones de control sin emulsionar en los mismos puntos temporales.
- 20 Las emulsiones se centrifugan en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 5 min a 4 °C y el aceite mineral se retira por aspiración, lo que deja la emulsión concentrada (pero aún intacta) en el fondo del tubo. Después de volver a centrifugar brevemente y retirar los restos de aceite mineral, se rompe la emulsión y se para la traducción con la adición de 100  $\mu\text{l}$  de tampón A (imidazol a 100 mM, pH 7,0,  $\beta$ -mercaptoetanol a 10 mM) que contiene puromicina a 125  $\mu\text{g/ml}$  y 1 ml de dietiléter saturado de agua. La mezcla se mezcla por agitación vorticial y se centrifuga en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 min a 4 °C. El éter y el aceite mineral disueltos se retiran por aspiración y se repite la extracción con 1 ml más de éter. El éter restante se retira por centrifugación durante 5 minutos en una Speedvac a temperatura ambiente. A las reacciones de 25  $\mu\text{l}$  de control sin emulsionar también se les añaden 100  $\mu\text{l}$  del tampón A que contiene puromicina (125  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 25 La actividad de la dihidrofolato reductasa se analiza mediante el seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADPH a NADP a 340 nm durante una cinética temporal de 10 minutos, tal y como se describe en Williams et al., 1979; Ma et al., 1993. Se añaden 10  $\mu\text{l}$  de cada reacción de traducción *in vitro* detenida a 150  $\mu\text{l}$  de tampón A (imidazol a 100 mM, pH 7,0,  $\beta$ -mercaptoetanol a 10 mM) y 20  $\mu\text{l}$  de NADPH a 1 mM. Se añaden 20  $\mu\text{l}$  de dihidrofolato (1 mM) ( $\text{H}_2\text{F}$ ) después de 1 minuto y se monitoriza la reacción a 340 nm con un lector de microplacas ThermoMax (Molecular Devices). La actividad se calcula mediante la velocidad inicial en condiciones ( $v_{\text{max}}$ ) de  $S_0 \gg K_M$ . La actividad de fondo en el extracto S30 se sustrae de todas las muestras.
- 30 La actividad de la DHFR generada en las emulsiones se toma de la diferencia de actividad medida a las 0 horas y a las 2 horas de incubación. No se produjo ningún incremento de oxidación del NADPH entre las muestras de 0 horas y de 2 horas cuando se añade el metotrexato a 0,1  $\mu\text{M}$  (un inhibidor específico de la DHFR), lo que demuestra que todo el incremento de oxidación del NADPH observado se debe a la DHFR sintetizada en las reacciones de traducción *in vitro*.
- 35 Con una homogeneización de 1 minuto a 20.000 rpm, la actividad DHFR generada en las emulsiones es el 31% de la encontrada en las reacciones de control sin emulsionar con 1,3 moléculas de ADN por microcápsula; el 45% con 3,9 moléculas de ADN por microcápsula; y el 84% con 11,8 moléculas de ADN por microcápsula.
- 40 Con una homogeneización de 5 minutos a 20.000 rpm, la actividad DHFR generada en las emulsiones es, de media, el 7% de la encontrada en las reacciones de control sin emulsionar con 0,3 moléculas de ADN por microcápsula; el 15% con 1 molécula de ADN por microcápsula; y el 35% con 2,9 moléculas de ADN por microcápsula.
- 45 Si se supone que el número de recambio de la DHFR es el descrito por Posner et al., 1996, esto corresponde a un rendimiento a la concentración de ADN más alta de 6,3  $\mu\text{g}$  (340 pmol) de DHFR por reacción de 100  $\mu\text{l}$  (control sin emulsionar), 1,98  $\mu\text{g}$  (104 pmol) de DHFR por reacción de 100  $\mu\text{l}$  (emulsionada durante 1 min), o 0,46  $\mu\text{g}$  (24,8 pmol) por reacción de 100  $\mu\text{l}$  (emulsionada durante 5 minutos). Esto equivale a 74 moléculas de DHFR por microcápsula en las emulsiones de 1 minuto y 44 moléculas por microcápsula en las emulsiones de 5 minutos (suponiendo que todas las microcápsulas tienen el tamaño medio).
- 50 La actividad de la DHFR resultante de la transcripción/traducción acopladas de los genes *foIA* también se mide en las microcápsulas más grandes producidas sólo por agitación, o por agitación seguida de una homogeneización adicional con un dispersador Ultra-Turrax T25 a 8000 rpm, 9000 rpm o 13.500 rpm durante 1 minuto, tal y como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se presentan en la figura 2b. La concentración de los genes *foIA* utilizados
- 55

(2,5 nM) da una media de 1, 1,5 y 4,8 elementos genéticos por gotita en las emulsiones homogeneizadas a 13.500 rpm, 9500 rpm y 8000 rpm, respectivamente, y una media de 14 elementos genéticos por gotita en la emulsión preparada sólo por agitación. La adición del desoxicolato de sodio (0,5%) a la mezcla de reacción de traducción *in vitro* no afecta significativamente la actividad DHFR observada en las emulsiones rotas.

- 5 Ejemplo 5: Conexión de un sustrato inmovilizado con un elemento genético mediante una proteína de alto peso molecular.

Para conectar muchas moléculas de sustrato inmovilizado a un fragmento de ADN que comprende el gen *foIA*, el fragmento de ADN se biotinila primero y luego se acopla a un complejo de avidina con apoferritina. La apoferritina de bazo de caballo es una molécula proteica grande casi esférica de 12,5 nm de diámetro que, por consiguiente,  
 10 proporciona varios sitios que se pueden modificar con el sustrato (p. ej., el grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas de la superficie). El plásmido pGEM-*foIA* que codifica la DHFR de *E. coli* se amplifica por PCR con los cebadores LMB3 y LMB2 biotinilado en 5' (LMB2-Biotina) para crear un fragmento de ADN de 649 pb biotinilado que lleva el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de traducción del gen *10* del fago T7 y el gen *foIA* (véase el ejemplo 3). El ADN se radiomarca al complementar la mezcla de reacción de PCR de 500  $\mu$ l con 100  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP  
 15 (Amersham; 3000 Ci/mmol). El fragmento de PCR biotinilado se purifica directamente con las Wizard PCR Preps (Promega) y la concentración se determina por espectrofotometría. El porcentaje de ADN biotinilado se analiza por fijación a Sipreptavidin M-280 Dynabeads (Dynal) y recuento de centelleo. Se determina que el 83% del ADN se biotinila con esta técnica.

El hierro aislado se retira de un conjugado comercial de avidina y ferritina (Avidina-Ferritina; aproximadamente 1,1 mol de ferritina por mol de avidina; Sigma) mediante diálisis durante una noche (4 °C) de una solución de avidina-ferritina en PBS (1 mg/ml) contra ácido tioglicólico a 0,12 M, pH 4,25, y después diálisis de 24 horas contra PBS (4 °C) tal y como describieron Kadir y Moore en 1990. La retirada del hierro se comprueba mediante análisis de los espectros de absorbancia (el Fe(III) aislado absorbe con fuerza a 310-360 nm).

Se incuban 0,3 pmol de ADN biotinilado y radiomarcado con distintas proporciones molares de avidina-apoferritina en PBS (9  $\mu$ l de volumen total) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retira una alícuota de 4,5  $\mu$ l y el porcentaje de ADN que forma complejo con avidina-apoferritina se analiza con el ensayo de desplazamiento de banda en un gel de agarosa al 1,5% como se describe en Berman et al., 1987. A continuación, el gel se seca y se escanea con un PhosphorImager (Molecular Dynamics). El porcentaje de ADN que no se desplaza (a saber, que no forma complejo con avidina-apoferritina) es del 17% (proporción molar 1:1 de avidina-apoferritina:ADN), del 15%  
 30 (proporción molar 5:1 de avidina-apoferritina:ADN) o del 14% (proporción molar 25:1 de avidina-apoferritina:ADN). Esto significa que incluso a una proporción 1:1 de avidina-apoferritina:ADN, básicamente todo el ADN biotinilado está fijado. No se observa ningún desplazamiento de bandas cuando se mezcla el ADN biotinilado con la apoferritina o cuando el ADN sin biotilar se mezcla con avidina-apoferritina.

Los restantes 4,5  $\mu$ l de ADN que forma complejo con avidina-apoferritina se utiliza como plantilla para una reacción de transcripción/traducción *in vitro* de 25  $\mu$ l (Sistema de extracto S30 de *E. coli* para plantillas lineales; Promega). Después de 2 horas a 25 °C se para la reacción con la adición de 100  $\mu$ l de tampón A que contiene puomicina (125  $\mu$ g/ml). La actividad de la dihidrofolato reductasa se analiza como se describió más arriba mediante el seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADPH en NADP a 340 nm durante una cinética temporal de 10 minutos.

A 150  $\mu$ l de tampón A y 10  $\mu$ l de NADPH (1 mM) se les añaden 10  $\mu$ l de cada reacción de traducción *in vitro*.  
 40 Después de 1 minuto se añaden 20  $\mu$ l de dihidrofolato (1 mM) (se rompen las emulsiones y se paran las reacciones con 0,5 ml de EDTA (50 mM) y 2 ml de dietiléter saturado de agua tal y como se describe en el ejemplo 1) y se sigue la reacción a 340 nm con un lector de microplacas ThermoMax (Molecular Devices). No se encuentra ninguna diferencia en la actividad DHFR incluso a la proporción más alta de avidina-apoferritina:ADN en comparación con un control que no lleva nada de avidina-apoferritina. Esto indica que la inmensa mayoría de ADN puede formar complejos sin comprometer la eficacia de la traducción *in vitro*.  
 45

Ejemplo 6: Tanto la transcripción-traducción *in vitro* como la actividad DHFR son compatibles en el mismo sistema.

Para seleccionar por la actividad DHFR producida *in situ* mediante la transcripción-traducción acopladas, tanto la reacción de transcripción-traducción como la DHFR deben ser activas en el mismo sistema de tampones. No resulta práctico el análisis directo de la actividad DHFR en un sistema de traducción de *E. coli* completo *in vitro* basado en el seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADPH en NADP a 340 nm debido a la turbidez de los extractos S30.  
 50

Sin embargo, es posible evaluar que la DHFR está activa en el mismo sistema de tampones que la traducción *in vitro*. La DHFR de *E. coli* se obtiene mediante inducción con IPTG de las bacterias que contienen el plásmido pGEM-*foIA* y la purificación por afinidad en una columna de metotrexato-Sepharose (Baccanari et al., 1977).

55 La actividad de la DHFR se compara en el tampón A tal y como se describe más arriba y en una mezcla completa de

traducción *in vitro*, salvo por la sustitución del tampón de diálisis de S30 (Lesley, 1995) (Tris-acetato a 10 mM, pH 8,0, acetato de magnesio a 14 mM, acetato de potasio a 60 mM, DTT a 1 mM) por la fracción S30. En cada caso, el volumen total de la reacción es de 200  $\mu$ l y la concentración de NADPH y las emulsiones se rompieron, y las reacciones se pararon con 0,5 ml de EDTA (50 mM) y 2 ml de dietiléter saturado de agua tal y como se describe en el ejemplo 1 cada 0,1 mM. Las reacciones se siguieron por espectrofotometría a 340 nm. La adición de 1,75 pmol (1,3 mUnidades) de DHFR de *E. coli* da una velocidad inicial de -25,77 mDO/min (en el tampón A) y de -11,24 mDO/min (en el tampón de traducción), con lo que la reacción tiene una eficacia del 44% en el tampón de traducción con respecto a un tampón optimizado (tampón A).

Además, la presencia de los sustratos de la DHFR (NADPH y H<sub>2</sub>F) a una concentración de 0,1 mM (por separado o en combinación) no ocasiona ninguna inhibición de la producción de DHFR activa a partir de una reacción de transcripción/traducción acopladas de 2 horas.

Ejemplo 7: La actividad DHFR en un elemento genético que contiene de sustrato dihidrofolato inmovilizado conduce a la formación de un producto de tetrahidrofolato conectado al ácido nucleico que codifica la DHFR.

Se sintetiza un péptido que comprende tres ácidos glutámicos conectados mediante sus  $\gamma$ -carboxilatos (con el N-fluorenilmetoxycarbonilglutamato de  $\alpha$ -bencilo como material de partida) con una lisina en el extremo carboxilo y la biotina unida a su grupo  $\epsilon$ -amino por modificación de los procedimientos publicados (Krumdiek et al., 1980). El ácido fólico se conecta al extremo amino y los grupos protectores bencilo y trifluoroacetamida se retiran mediante hidrólisis alcalina, tal y como se describió previamente. El péptido se purifica por HPLC en fase inversa y se caracteriza por espectroscopia de masas y UV. Este péptido de ácido fólico se reduce químicamente al correspondiente péptido de ácido dihidrofólico (con ditionato y ácido ascórbico) y, luego, al correspondiente péptido de ácido tetrahidrofólico (con borohidruro de sodio) mediante la aplicación de los procedimientos publicados (Zakriewski et al., 1980). Estas transformaciones se caracterizan mediante espectroscopia de UV.

Se construye un elemento genético mediante la conexión, de media, de dos o tres moléculas del péptido de ácido fólico a avidina (o a estreptavidina) junto con una molécula del ADN que codifica la DHFR amplificado por PCR a partir del plásmido pGEM-*foIA* con los cebadores LMB2-Biotina (SEQ ID n.º 9) y LMB3 (véase el ejemplo 3). El ácido fólico inmovilizado se reduce químicamente a dihidrofolato con ditionato y ácido ascórbico, y se purifica mediante diálisis contra el tampón A. La DHFR de *E. coli* se obtiene por inducción con IPTG de las bacterias que contienen el plásmido pGEM-*foIA* y la purificación por afinidad en una columna de metotrexato-Sepharose. Se muestra que la DHFR de *E. coli* reacciona con el ácido dihidrofólico inmovilizado en este elemento genético mediante el seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADPH en NADP con 0-10  $\mu$ M del péptido de ácido dihidrofólico conectado a avidina y NADPH a 0-50  $\mu$ M. Por lo tanto, al final de esta reacción, el producto tetrahidrofolato está conectado al gen *foIA* que codifica la enzima (a saber, la DHFR) que cataliza su formación.

Existen dos técnicas para aislar los genes unidos al producto tetrahidrofolato. La primera implica la generación de anticuerpos expuestos en fagos específicos contra el tetrahidrofolato (Hoogenboom, 1997). La segunda técnica se basa en el uso de un reactivo etiquetado que reacciona específicamente con el producto inmovilizado, pero no con el sustrato. Hemos sintetizado una molécula que consiste en una etiqueta de dinitrofenilo (DNP) conectada al benzaldehído mediante un espaciador de 14 átomos. El grupo aldehído reacciona específicamente con el tetrahidrofolato para formar un aducto covalente (Kallen y Jencks, 1966) y puede realizarse la purificación por afinidad con un anticuerpo anti-DNP.

Ejemplo 8: Un procedimiento alternativo para seleccionar por la actividad DHFR.

La reacción catalizada por la DHFR puede seleccionarse mediante el acoplamiento *in situ* a una segunda reacción, catalizada por la aldehído deshidrogenasa de levadura, con un sustrato «etiquetado».

En vez de seleccionar los genes conectados a uno de los productos de la reacción de la DHFR (5,6,7,8-tetrahidrofolato o NADP<sup>+</sup>), la reacción de la DHFR se acopla a una segunda reacción. En este caso, la selección se basa en la formación del segundo producto de la reacción catalizada por la DHFR, el fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP<sup>+</sup>).

La reacción que hemos elegido acoplar está catalizada por la aldehído deshidrogenasa de levadura (YAD, por su nombre en inglés; EC 1.2.1.5). Esta enzima utiliza tanto NAD<sup>+</sup> como NADP<sup>+</sup> para la oxidación de un amplio abanico de aldehídos alifáticos y aromáticos en sus correspondientes ácidos carboxílicos, lo que genera NADH o NADPH durante el proceso. La reacción tiene la gran ventaja de ser esencialmente irreversible, es decir, las deshidrogenasas (entre ellas, DHFR y YAD) no catalizan la reducción que devuelve el ácido a aldehído. Ya que un gran número de enzimas que catalizan las reacciones de óxido-reducción generan NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>, la reacción de la YAD también puede utilizarse en la selección de estas enzimas, y no se limita sólo a la selección de la dihidrofolato reductasa.

Se sintetiza un sustrato pentaldehídico y se conecta a una etiqueta de DNP (dinitrofenilo) mediante un conector C<sub>20</sub>

(de aquí en adelante, DNP-PA). La oxidación del DNP-PA en el correspondiente ácido (DNP-PC) se sigue mediante HPLC (columna C<sub>18</sub> de fase inversa; gradiente de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN + ácido trifluoroacético al 0,1%; tiempos de retención: DNP-PA, 5,0 min; DNP-PC, 4,26 min). La conversión del DNP-PA en DNP-PC se observa sólo en presencia de YAD y de NADP<sup>+</sup>. Las reacciones se siguen por espectrofotometría; el incremento de la absorbancia a 340 nm indicó que el NADP<sup>+</sup> se convierte simultáneamente en NADPH.

5

La reacción de DHFR acoplada a la YAD se sigue con el mismo ensayo de HPLC. La mezcla de reacción inicial contenía los sustratos para DHFR: NADPH (50 µM) y 7-8-hidrofolato (H<sub>2</sub>F; 50 µM), YAD (Sigma, 0,5 unidades) y DNP-PA (50 µM) en tampón a pH 7,7 (imidazol a 100 mM, β-mercaptoetanol a 5 mM y KCl a 25 mM). La conversión del DNP-PA en DNP-PC se observa cuando se añade la DHFR a la mezcla de reacción anterior (DHFR a 5 nM, 83%; 1,25 nM, 14,5% después de 32 min).

10

La concentración de la DHFR obtenida en la traducción *in vitro* compartimentada es, de hecho, mucho más elevada que 5 nM (véase el ejemplo 4). La conversión del DNP-PA en DNP-PC es despreciable en ausencia de la DHFR, o cuando el metotrexato (MTX), un potente inhibidor de la enzima, está presente (10 µM). Así pues, la formación del producto secundario, el DNP-PC, está por lo tanto conectado a la presencia de la DHFR.

15 Con esta reacción acoplada se pueden seleccionar las proteínas que confieren actividad DHFR mediante: i) conexión de los genes a los anticuerpos que se fijan específicamente al producto carboxílico del DNP-PA, y ii) aislamiento de estos genes mediante purificación por afinidad con un anticuerpo anti-DNP.

Esta estrategia se demuestra mediante un inmunoensayo convencional basado en el ELISA acoplado a la CAT (Tawfik et al., 1993). Las placas de microtitulación se revisten con inmunoglobulinas anti-conejo (Sigma, 10 µg/pocillo) y luego con suero policlonal de conejo que se fija específicamente a los derivados del ácido glutámico (Tawfik et al., 1993) diluido 1:500 en un tampón salino con fosfato + SAB a 1 mg/ml. Se enjuagan las placas y se bloquean con SAB. Las mezclas de reacción acopladas descritas más arriba se diluyen en tampón Tris/SAB (Tris a 50 mM, cloruro de sodio a 150 mM, SAB a 10 mg/ml, pH 7,4) y se incuban durante 1 hora. Se enjuaga la placa y se añade un anticuerpo anti-DNP (SPE21.11 monoclonal de ratón) diluido en el mismo tampón (1:10.000) y se incuba durante una hora. Se enjuaga la placa y se le añade el anticuerpo antirratón marcado con peroxidasa (Jackson) seguido de un sustrato de peroxidasa (BM Blue; Boehringer Mannheim). Se observa una señal específica en las muestras de las reacciones acopladas que contenían la DHFR (además de H<sub>2</sub>F, NADPH, YAD y DNP-PA).

20

25

Se utilizan anticuerpos muy específicos contra el ácido carboxílico (Tawfik et al., 1993) para la selección en dos formatos.

30 En el primero, el anticuerpo contra el ácido carboxílico se acopla químicamente a una avidina (o estreptavidina) de alto peso molecular que contiene el complejo que se describe en el ejemplo 5. El ADN biotinilado que codifica la DHFR se acopla a este complejo mediante la interacción avidina-biotina, tal y como se describe en el ejemplo 5. Este complejo se utiliza entonces en un sistema de transcripción/traducción acopladas compartimentado que también contiene la YAD y un sustrato de YAD etiquetado, tal como el DNP-PA. Si hay actividad DHFR en el compartimento, el DNP-PA se convierte en el DNP-PC. Los anticuerpos contra el ácido carboxílico, acoplados al ADN mediante el complejo de alto peso molecular capturarán sólo las moléculas de DNP-PC y no las moléculas de aldehído. A continuación se purifica por afinidad con los anticuerpos anti-DNP el ADN de esos compartimentos que contienen la DHFR activa (y, por lo tanto, que codifican la DHFR activa si sólo hay una molécula de ADN por compartimento).

35

40 En el segundo formato se enganchan varias moléculas de estreptavidina en un complejo de alto peso molecular que puede acoplarse fácilmente al ADN biotinilado que codifica la DHFR (véase el ejemplo 5). Este complejo se utiliza en un sistema de transcripción/traducción acopladas compartimentado que también contiene la YAD y un sustrato de YAD, tal como el MeNPOC-biotina-benzaldehído. El grupo biotina del MeNPOC-biotina-benzaldehído está «enjaulado» (Sundberg et al., 1995; Pirrung y Huang, 1996), es decir, no se puede fijar a la avidina o a la estreptavidina hasta que se haya retirado por escisión mediante irradiación con luz el grupo de nitrobenzilo fotorretirable. Si hay actividad DHFR en el compartimento, el MeNPOC-biotina-benzaldehído se convierte en MeNPOC-biotina-ácido benzoico. Después de que la reacción compartimentada haya transcurrido durante un rato, la reacción se irradia con luz, con lo que se retira el grupo nitrobenzilo y el compuesto se fijará al complejo de estreptavidina-ADN. El ADN de los compartimentos que contienen la DHFR activa (y, por lo tanto, que codifican la DHFR activa si hay sólo una molécula de ADN por compartimento) forma complejo con biotina-ácido benzoico (en vez de biotina-benzaldehído) y puede purificarse por afinidad con los anticuerpos inmovilizados contra el ácido benzoico.

45

50

La presencia de otras enzimas que pueden catalizar la oxidación del NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> en el NADH o NADPH en el sistema de transcripción/traducción *in vitro* puede, en algunas circunstancias, hacer difícil el uso de este sistema de YAD para la selección directa en el sistema de transcripción/traducción *in vitro* compartimentado. En este caso, la selección se lleva a cabo con el sistema de compartimentación en dos etapas descrito anteriormente. Es decir, la DHFR se traduce primero en los compartimentos y luego se conecta al ADN en el mismo compartimento por medio

55

de una etiqueta de afinidad adecuada. Se rompe la emulsión, se agrupa el contenido de los compartimentos y el ADN se purifica por afinidad del resto de los componentes del sistema de transcripción/traducción (que incluyen las óxido-reductasas contaminantes), con el uso de anticuerpos específicos contra una «etiqueta» de digoxigenina unida a un extremo de la molécula de ADN. Las moléculas de ADN purificadas, junto con la proteína DHFR unida, se colocan entonces en una mezcla de reacción que contiene los sustratos de la DHFR: NADPH (50  $\mu$ M) y 7-8-dihidrofolato ( $H_2F$ ; 50  $\mu$ M), YAD (Sigma, 0,5 unidades) y DNP-PA (50  $\mu$ M) en tampón a pH 7,7 (imidazol a 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol a 5 mM y KCl a 25 mM) y la reacción se vuelve a compartimentar mediante emulsión para dar sólo una, o como mucho unas pocas, moléculas de ADN por compartimento. Los anticuerpos contra el ácido carboxílico (Tawfik et al., 1993) se utilizan para la selección en cualquiera de los dos formatos descritos más arriba.

#### 10 Ejemplo 9: Metilación de los elementos genéticos mediante los productos génicos.

Las ADN metiltransferasas, producidas por transcripción/traducción *in vitro* en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite, metilan las moléculas de ADN que las codifican en los compartimentos.

La selección de proteínas con actividad fijadora o catalítica gracias al uso del sistema de compartimentación descrito aquí presenta dos requisitos básicos: i) que se exprese una única molécula de ADN (o como mucho unas pocas moléculas) que codifica las proteínas a seleccionar en una forma biológicamente activa mediante un sistema de transcripción/traducción acopladas en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite; y ii) la proteína a seleccionar debe ser capaz de modificar el elemento genético que la codifica de tal forma que se pueda seleccionar en una etapa posterior. En este ejemplo describimos un grupo de proteínas ADN metiltransferasas (tipo II), que se producen de forma eficaz en los compartimentos acuosos de un sistema de emulsión de agua en aceite mediante un sistema de transcripción/traducción acopladas. Además, las ADN metiltransferasas traducidas *in vitro* modifican con eficacia *in situ* las moléculas de ADN que las codifican en los compartimentos acuosos de tal forma que pueden seleccionarse y amplificarse. Los sitios diana en las moléculas de ADN se modifican por metilación de una citosina en la posición C5, lo que convierte los sitios en resistentes a la escisión por la endonucleasa de restricción cognada (a saber, *HhaI* para *M.HhaI*, y *HaeIII* para *M.HaeIII*). Así pues, el ADN metilado se puede seleccionar entre los ADN sin metilar en virtud de su resistencia a que lo escinda la endonucleasa de restricción.

El gen que codifica la *M.HhaI* se amplifica por PCR con los oligonucleótidos *HhaI-Fo2S* y *HhaI-Bc* directamente de *Haemophilus parahaemolyticus* (ATCC 10014). El gen que codifica la *M.HaeIII* se amplifica por PCR con los oligonucleótidos *HaeIII-Fo2s* y *HaeIII-Bc* (SEQ ID n.º 4) directamente de *Haemophilus influenzae* (biogrupo *aegyptius*) (ATCC 11116). Ambos fragmentos de PCR se clonan en el vector pGEM-4Z (Promega) digerido con *HindIII* y *KpnI* cadena abajo del promotor de *lac* y del promotor de la ARN polimerasa de T7. Los oligonucleótidos *HhaI-Bc* y *HaeIII-Bc* (SEQ ID n.º 4) adjuntan el sitio de inicio de la traducción eficaz del gen 10 del fago T7 por delante del codón de inicio del gen de la metiltransferasa. El oligonucleótido *HhaI-Fo* adjunta un sitio de metilación/restricción (M/R) *HhaI* y un sitio *HaeIII* (*NotI*) para que hagan de sustrato de *M.HhaI* y *M.HaeIII*, respectivamente. El oligonucleótido *HaeIII-Fo* adjunta un sitio de M/R para *NotI/HaeIII* que funciona como sustrato para *M.HaeIII* (el gen *M.HaeIII* ya contiene dos sitios de M/R internos para *HhaI*). La secuenciación del ADN identifica los clones con la secuencia nucleotídica correcta.

Los plásmidos pGEM-*M.HhaI* y pGEM-*M.HaeIII* descritos más arriba se amplifican por PCR con los cebadores LMB2-Biotina (SEQ ID n.º 9) y LMB3-DIG (SEQ ID n.º 10) al igual que antes para crear bien el fragmento de ADN DIG-*M.HhaI*-Biotina de 1167 pares de bases o el fragmento de ADN DIG-*M.HaeIII*-Biotina de 1171 pares de bases, marcados en un extremo con biotina y en el otro extremo con digoxigenina, y que llevan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, el gen de la metiltransferasa y los sitios de M/R para *HaeIII* y *HhaI*. Los fragmentos de PCR se purifican cada uno directamente con las Wizard PCR Preps (Promega).

Los genes requeridos para la transcripción-traducción acopladas *in vitro* de *M.EcoRI* y *M.EcoRV* se amplifican por PCR con los plásmidos pMB1 (Betlach et al., 1976) y pLB1 (Bougueleret et al., 1984), respectivamente, como plantilla, un cebador inverso que adjunta el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7 y LMB3 por delante del sitio de fijación del ribosoma del gen de la metiltransferasa (*EcoRI-Bc* o *EcoRV-Bc*) y un cebador directo (*EcoRI-Fo* o *EcoRI-Fo*) que adjunta LMB2. Estos fragmentos se amplifican adicionalmente por PCR con los cebadores LMB2-Biotina (SEQ ID n.º 9) y LMB3-DIG (SEQ ID n.º 10) tal y como se describe más arriba para crear los fragmentos de ADN DIG-*M.EcoRI*-Biotina y DIG-*M.EcoRV*-Biotina que llevan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, el gen de la metiltransferasa y los sitios de M/R para *EcoRI* y *EcoRV*. Estos fragmentos de PCR se purifican cada uno directamente con las Wizard PCR Preps (Promega).

Los genes de las ADN-metilasas amplificadas por PCR que se describen más arriba se expresan en un sistema procarionta de transcripción/traducción acopladas *in vitro* diseñado para plantillas lineales (Lesley et al., 1991). Se utiliza una preparación comercial de este sistema (Sistema de extracto S30 de *E. coli* para plantillas lineales; Promega) complementado con la ARN polimerasa de T7 y S-adenosil-metionina (SAM) a una concentración de 80  $\mu$ M.

Se analiza la metilación midiendo la resistencia a la escisión que presentan los fragmentos de ADN marcados con DIG y biotina frente a la enzima de restricción cognada mediante ELISA con DIG-Biotina de Boehringer-Mannheim o con fragmentos de ADN marcados radiactivamente y perlas magnéticas revestidas con estreptavidina. Las mezclas de reacción *in vitro* que contienen fragmentos marcados con DIG-Biotina que reaccionaron *in situ* mediante transcripción-traducción acopladas *in vitro* como se describe más adelante se diluyen en el tampón W&B a 1X (NaCl a 1M, Tris a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 7,4) + Tween 20 al 0,1 % (la concentración del ADN marcado con DIG/Biotina en el ensayo se encuentra en el intervalo de 0-250 pM) y se incuban en placas de microtitulación revestidas con estreptavidina (capacidad alta) durante 30-60 min. Se enjuaga la placa (3 veces con W&B a 2X y finalmente con Tris a 50 mM, pH 7,4 + MgCl<sub>2</sub> a 5 mM) y se añaden las enzimas de restricción (NEB) (10-50 unidades de enzima en 0,2 ml del correspondiente tampón) y se incuban a 37 °C durante 3-12 horas. Se enjuaga la placa y se añaden los anticuerpos anti-DIG conjugados a peroxidasa (diluidos 1:1.500 en PBS + Tween 20 al 0,1% + SAB a 2 mg/ml) durante 40-60 min y luego se añade el sustrato de la peroxidasa (BM Blue; 70 µl/pocillo). Se mide la absorbancia (a 450 nm menos la de 650 nm) después de parar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,5 M (130 µl/pocillo).

Para el ensayo radiactivo, los plásmidos y los fragmentos de PCR descritos más arriba se amplifican por PCR con los cebadores LMB2-Biotina (SEQ ID n.º 9) y LMB3, y α-<sup>32</sup>P-CTP, para dar fragmentos de ADN marcados con <sup>32</sup>P en un extremo con biotina y que llevan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, el gen de la metiltransferasa y los sitios de M/R relevantes. Estos fragmentos de PCR se purifican directamente con las Wizard PCR Preps (Promega). Las mezclas de reacción que contienen el ADN marcado con Biotina y <sup>32</sup>P que reaccionaron *in situ* mediante transcripción-traducción acopladas *in vitro* se diluyen en tampón W&B a 1X + Tween 20 al 0,1% y se incuban con perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (Dyna, M-280; 1-5 x 10<sup>6</sup> perlas) durante 30-60 min. Las perlas se separan y se enjuagan (3 veces con W&B a 2X + Tween 20 al 0,1% + SAB al 3% y finalmente con Tris a 50 mM, pH 7,4 + MgCl<sub>2</sub> a 5 mM). Las enzimas de restricción (NEB) se añaden (10-50 unidades de enzima en 50-150 µl del correspondiente tampón) y se incuban a 37 °C durante 5-20 horas. Se retira el sobrenadante, se enjuagan las perlas y se resuspenden en 100 µl de agua. La cantidad del ADN marcado radiactivamente en las perlas y en los sobrenadantes se determina por centelleo.

Las cuatro metilasas descritas aquí (*M.HaeIII*, *M.HhaI*, *M.EcoRI* y *M.EcoRV*) se expresan y están activas en la transcripción/traducción acopladas *in vitro*. Además, la metilasa traducida *in vitro* es capaz de metilar su propio gen, haciéndolo resistente a la escisión por la metilasa cognada (autometilación). Ambos procesos, la transcripción-traducción acopladas *in vitro* del gen de la metilasa así como su metilación ocurren con eficacia en la misma mezcla de reacción. Más específicamente, los fragmentos de ADN (a concentraciones de 0,5 a 10 nM) que llevan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, un gen de metiltransferasa y los sitios de M/R de las cuatro metilasas, se vuelven resistentes a la escisión por la endonucleasa de restricción cognada. Por ejemplo, el fragmento de ADN que codifica la metiltransferasa *M.EcoRI* se vuelve resistente a la escisión por *EcoRI* (75%-100% después de 20-90 minutos a 25 °C) cuando se incuba con el sistema de extracto S30 de *E. coli* para plantillas lineales (Promega), SAM (80 µM) y la ARN polimerasa de T7. La resistencia a la escisión como resultado de la metilación es selectiva y específica: en las mismas condiciones no se observa resistencia a la escisión por *HhaI* ni por *M.EcoRV*; además, no se observa resistencia a la escisión por *EcoRI* cuando se inhibe la traducción (p. ej., en presencia de puromicina o en ausencia de la ARN polimerasa de T7). Se obtuvieron resultados similares cuando la supervivencia de los genes se analiza mediante ELISA con DIG-Biotina o con fragmentos de ADN marcados con Biotina y <sup>32</sup>P tal y como se describe más arriba. La metilación en *trans*, a saber, de fragmentos de ADN (diferentes a los que codifican la metilasa cognada) que adjuntan sitios de M/R, también se observa en el sistema de transcripción/traducción acopladas *in vitro* con S30 de *E. coli* en presencia de un gen que codifica una metilasa.

Ambos procesos, la transcripción/traducción acopladas *in vitro* de los genes de las metilasas así como su autometilación continuaron con eficacia en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite. Más específicamente, los fragmentos de ADN (a una concentración de 0,1-10 nM) que llevan el promotor de la ARN polimerasa de T7, el sitio de inicio de la traducción del gen 10 del fago T7, el gen de la metiltransferasa (por ejemplo, *M.HhaI*) y los sitios de M/R para *HaeIII*, *HhaI* y *EcoRI* se añaden al sistema de extracto S30 de *E. coli* para plantillas lineales (Promega) en presencia de SAM (80 µM) y de la ARN polimerasa de T7. Las mezclas de reacción enfriadas en hielo se emulsionan por homogeneización durante 1 minuto con un dispersador Ultra-Turrax T25 a 20.000 rpm tal y como se describe en el ejemplo 1, y se incuban a 25-30 °C durante 0-180 min. Se para la reacción, se separa la fase acuosa (véase el ejemplo 1) y la metilación de los fragmentos de ADN marcados con DIG-biotina o Biotina-<sup>32</sup>P se analiza tal y como se describe más arriba. La metilación de hasta el 20% de los genes compartimentados a escindir con *HhaI* se observa tras 60-180 min de incubación. No se observa ninguna resistencia cuando la emulsión enfriada en hielo se rompe justo después de montarla y la reacción se para mediante extracción con éter («0 menos»). La metilación es selectiva: en las mismas condiciones no se observa resistencia a la escisión por *HaeIII* o *EcoRI*. Además, el análisis de los fragmentos de ADN marcados con <sup>32</sup>P ha demostrado que la autometilación tanto de *M.HaeIII* como de *M.HhaI* ocurre a concentraciones de los genes que corresponden a una media de menos de un gen por compartimento (0,1-0,5 nM; véase el ejemplo 4). Así pues, la transcripción-traducción acopladas *in vitro* de los genes de las metilasas así como su autometilación ocurre con eficacia incluso cuando en los compartimentos acuosos de la emulsión de agua en aceite está presente un único elemento genético.

La actividad de la metilasa *HaeIII* resultante de la transcripción/traducción acopladas de los genes de *M.HaeIII* también se mide en las microcápsulas más grandes producidas únicamente por agitación, o por agitación seguida de más homogeneización con un dispersador Ultra-Turrax T25 a 8000 rpm, 9000 rpm o 13.500 rpm durante 1 minuto tal y como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se presentan en la figura 2b. La concentración de los genes de *M.HaeIII* utilizados (2,5 nM) da una media de 1, 1,5 y 4,8 elementos genéticos por gotita en las emulsiones homogeneizadas a 13.500 rpm, 9500 rpm y 8000 rpm, respectivamente, y una media de 14 elementos genéticos por gotita en la emulsión preparada sólo por agitación. La adición de un tensioactivo aniónico, p. ej., desoxicolato de sodio, típicamente al 0,5% (p/v), a la mezcla de traducción *in vitro* incrementa significativamente el porcentaje de elementos genéticos metilados en las emulsiones.

10 Ejemplo 10: Los elementos genéticos que codifican las ADN metiltransferasas se pueden seleccionar y amplificar siguiendo su autometilación en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua en aceite.

La metilación de los genes que codifican las ADN metilasas permite su aislamiento y amplificación en una etapa posterior. El ADN metilado se puede seleccionar entre el ADN sin metilar en virtud de su resistencia a la escisión por la endonucleasa de restricción. Así pues, los elementos genéticos que permanecen intactos tras el tratamiento con la enzima de restricción cognada se pueden amplificar por PCR. Sin embargo, no se puede conseguir tal selección obviamente si otros genes que contienen el mismo sitio de R/M, pero que no codifican la metilasa, están presentes en la misma reacción. Esto es porque la metilación cruzada de los genes que no son de metilasa (que están presentes a un gran exceso) los hará resistentes a la escisión por la enzima de restricción cognada y, por lo tanto, se podrán amplificar por PCR. En estas condiciones, sólo será posible la selección de los genes codificantes de metilasas si están compartimentados, es decir, sólo si uno, o unos pocos, genes están presentes en un único compartimento de manera que la autometilación es el principal proceso en ese compartimento. Se evita la metilación cruzada dado que permanecerán sin metilar los genes que no son de metilasa que están presentes en los compartimentos que no contienen un gen de metilasa.

Los genes utilizados en el experimento son un fragmento de *M.HaeIII* de 1194 pares de bases (DIG-*M.HaeIII*-3s-Biotina) que codifica la metilasa *HaeIII* y un fragmento de *foIA* de 681 pares de bases (DIG-*foIA*-3s-Biotina) que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que contiene otros sitios de restricción/modificación para *HaeIII* y *HhaI* (véase la figura 1b). Ambos fragmentos de ADN están marcados en un extremo con digoxigenina (DIG) y en el otro con biotina, y contienen un promotor de la ARN polimerasa de T7 (Promotor de T7) y el sitio de inicio de la traducción del gen *10* del fago T7 (rbs) para la expresión *in vitro*.

30 El pGEM-4Z-3s se crea mediante la hibridación de los oligonucleótidos HaeHha-P1 y HaeHha-Mi (SEQ ID n.º 2) (tabla 1) y ligándolos al pGEM-4Z (Promega) cortado con *HindIII* y *EcoRI*. El gen de *M.HaeIII* se amplifica por PCR a partir de *Haemophilus influenzae* (biogrupo *aegyptius*) (ATCC 11116) con los oligonucleótidos *HaeIII*-FoNC (SEQ ID n.º 3) y *HaeIII*-Bc (SEQ ID n.º 4) (tabla 1). El gen *foIA* se amplifica a partir de *Escherichia coli* con los cebadores EDHFR-Fo (SEQ ID n.º 5) y EDHFR-Ba (SEQ ID n.º 6) (tabla 1). Ambos genes amplificados se digieren con *HindIII* y *KpnI* y se clonan en el pGEM-4Z-3s, con lo que se crean los vectores de expresión pGEM-*HaeIII*-3s y pGEM *foIA*-3s. Los fragmentos DIG-*M.HaeIII*-3s-Biotina y DIG-*foIA*-3s-Biotina (véase la figura 1b) se amplifican de estos vectores por PCR con la polimerasa *Pfu* y los cebadores LMB2-Biotina (SEQ ID n.º 9) y LMB3-DIG (SEQ ID n.º 10) (20 ciclos), y se purifican con las Wizard PCR Preps (Promega). El DIG-D1.3-Biotina, un fragmento de ADN de 942 pb que contiene cuatro sitios de R/M para *HaeIII* utilizado como sustrato para analizar la actividad de la metilasa *HaeIII*, se amplifica de un derivado de pUC19 que contiene un gen D1.3-Fv monocatenario (McCafferty et al., 1990) como se describe más arriba. Un ADN de arrastre de 558 pb (ADN de arrastre de g3; un fragmento interno del gen III del fago fd que no tiene el promotor de T7 ni sitios de R/M para *HhaI* o *HaeIII*) se amplifica por PCR con la polimerasa *Taq* a partir del ADN de pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991) y con los cebadores G3FRAG-Fo (SEQ ID n.º 11) y G3FRAG-Ba (SEQ ID n.º 12) (tabla 1), y se purificó por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Este ADN (a  $\geq 10$  nM) se utilizó de arrastre en la dilución de todo el ADN utilizado para las reacciones de este ejemplo.

La figura 3 muestra la selección de los genes de *M.HaeIII* que codifican la ADN metilasa *HaeIII* a partir de un exceso de los genes *foIA* (que codifican la DHFR que no metila el ADN). Ambos genes tienen adjuntas las mismas secuencias de R/M para *HaeIII* para actuar de sustrato (figura 1b). Después de la traducción en los compartimentos acuosos de una emulsión, se metilan las secuencias de R/M para *HaeIII* adjuntas a los genes de la metilasa. Estos genes se hacen resistentes a la escisión por la endonucleasa *HaeIII* y, posteriormente, se amplifican por PCR. Los genes *foIA*, presentes en otros compartimentos, permanecen sin metilar, se escinden y no se amplifican. Los productos de la PCR se analizan por electroforesis en gel de agarosa, donde enriquecimiento de los genes de *M.HaeIII* se puede visualizar mediante la aparición de una banda de 1194 pb (figura 2b).

55 Se utiliza el sistema del extracto S30 de *E. coli* para ADN lineal (Promega), complementado con el ADN de arrastre de g3 (10 nM), fragmentos de ADN (DIG-*M.HaeIII*-3s-Biotina y DIG-*M.foIA*-3s-Biotina en las proporciones y concentraciones indicadas más adelante), ARN polimerasa de T7 ( $10^4$  unidades), desoxicolato de sodio (Fluka, 0,5% p/v; sólo en las reacciones emulsionadas) y S-adenosilmetionina (NEB, 80  $\mu$ M). Las reacciones se montan con los

- fragmentos de ADN DIG-M.*HaellI*-3s-Biotina y DIG-M.*foIA*-3s-Biotina a una proporción de 1:10<sup>3</sup> y a una concentración total de 200 pM (figura 3a) y a las proporciones 1:10<sup>4</sup> a 1:10<sup>7</sup> y una concentración total de 500 pM (figura 3b). Se preparan reacciones de 50 µl en hielo y se emulsionan sólo mediante agitación tal y como se describe en el ejemplo 1. Las reacciones se incuban durante 2 horas a 25 °C. Para recuperar las mezclas de reacción, las emulsiones se centrifugan a 3000 g durante 5 minutos y se retira la fase oleosa, dejando la emulsión concentrada en el fondo del vial. Se añade el tampón de parada (0,2 ml de ARN de levadura a 25 µg/ml en el tampón W+B: 1 M de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,4) y 2 ml de éter saturado de agua, y la mezcla se mezcla con agitación vorticial, se centrifuga brevemente, y se retira la fase de éter. La fase acuosa se lava con éter y se seca (5 minutos en una Speedvac a temperatura ambiente). Se captura el ADN en 100 µg de Dynabeads M-280 con estreptavidina (2 horas a temperatura ambiente). Las Dynabeads se lavan secuencialmente con: tampón W+B; 2,25 M de guanidina-HCl, 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4; tampón W+B; y dos veces con el tampón de restricción. Las perlas se resuspenden en 100 µl de tampón de restricción que contiene 10 unidades de *HaellI* (o *Hhal*) y se incuban a 37 °C durante 5 horas. Se lavan las perlas 3 veces con el tampón W+B, dos veces con 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, Triton X-100 al 0,1%, pH 9,0 y luego se resuspenden en 100 µl del mismo tampón complementado con MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM (tampón de PCR). Se amplifican las alícuotas de las perlas (2-20 µl) por PCR con la polimerasa *Taq* añadida a 94 °C con los cebadores LBM2-Biotina y LBM3-DIG (reacciones de 50 µl; 32 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 2 minutos a 72 °C). Este ADN se purifica con las Wizard PCR Preps y se utiliza para la segunda ronda de selección (20 pM en las selecciones 1:10<sup>4</sup> y 1:10<sup>5</sup>, y 500 pM en las selecciones 1:10<sup>6</sup> y 1:10<sup>7</sup>). Para la electroforesis en gel y los análisis de la actividad, este ADN (diluido a aproximadamente a 1 pM) se amplifica adicionalmente con los cebadores LBM2-Nest y LMB3-Nest que se hibridan inmediatamente dentro de LMB2 y LMB3, respectivamente (25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C, 1,5 minutos a 72 °C) y se purifican como más arriba. Este ADN (a 10 nM), al que no se han adjuntado ni DIG ni biotina, también se traduce *in vitro* en presencia de DIG-D1.3-Biotina a 10 nM, un ADN de 942 pb que contiene cuatro sitios de R/M para *HaellI*. La metilación del sustrato DIG-D1.3-Biotina se determina por ELISA con DIG-Biotina como en el ejemplo 9.
- 25 Una única ronda de selección de una proporción de 1:1000 de los genes *M.HaellI:foIA* en la emulsión da lugar aproximadamente una proporción de genes final de 1:1 (figura 3a). Varios experimentos de control indican que la selección continúa de acuerdo con el mecanismo descrito más arriba: *no* se observa una banda que corresponde al gen *M.HaellI* cuando la mezcla inicial de genes se amplifica por PCR; ni después de la reacción en solución (no emulsionada); ni cuando se emulsiona en ausencia de transcripción/traducción (cuando se omite la ARN polimerasa de T7); ni cuando los genes que reaccionaron están escindidos en los sitios de R/M diferentes de los de *HaellI*, p. ej, después de la digestión con *Hhal*. El rendimiento del ADN de *M.HaellI* después de la selección está por debajo del 100%, principalmente debido a la digestión incompleta por *HaellI* y no a la metilación cruzada, como indica la gran banda de *foIA* observada en ausencia de actividad metilasa (cuando no se añade la polimerasa de T7). Durante la digestión, la concentración del ADN cae bien por debajo de la K<sub>M</sub> de *HaellI* (6 nM) y la digestión se vuelve muy
- 35 ineficiente.

- También se vuelve visible una banda, que corresponde a los genes de *M.HaellI*, después de una única ronda de selección que comienza con las proporciones 1:10<sup>4</sup> a 1:10<sup>5</sup> de *M.HaellI:foIA* (figura 3b), pero no a las proporciones más bajas, lo que indica que el factor de enriquecimiento es de al menos 5000 veces. Por consiguiente, la selección de un pequeño número de genes a partir de un gran conjunto (p. ej., una genoteca) requiere más rondas de
- 40 selección. Cuando el ADN amplificado y digerido con *HaellI* de la primera ronda de selección se somete a una segunda ronda de selección, una banda que corresponde a los genes *M.HaellI* también se vuelve visible a las proporciones iniciales de 1:10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> de *M.HaellI:foIA*. También se realiza una segunda ronda de selección sobre el ADN obtenido de las proporciones iniciales de 1:10<sup>4</sup> a 1:10<sup>5</sup> de *M.HaellI:foIA*. Esto ofrece un enriquecimiento adicional, hasta una proporción de aproximadamente 3:1 a favor de los genes *M.HaellI*. Antes y después de cada
- 45 ronda de selección, los genes se amplifican, se traducen *in vitro* y se hacen reaccionar con un sustrato de ADN distinto para analizar la actividad de la metilasa *HaellI*. Estos ensayos indican que el enriquecimiento de los genes de *M.HaellI* que se observa mediante la electroforesis en gel da lugar a un incremento paralelo en la actividad de la metilasa *HaellI* (figura 3b).

Tabla 1: Oligonucleótidos

|             |   |
|-------------|---|
| HaeHha-P1   | 5'-AGCTTGCCATGCGGTACC GGCCATGCGCATGGCCTAGCGCATGGCGCCGCTAGCGCG-3' (SEQ. ID. No. 1)   |
| HaeHha-Mi   | 5'-AATTGCGCGTAGCGGCCGATGGCTAGGCCATGGCATGGCCGGTACCGCAGGCATGCA-3' (SEQ. ID. No. 2)  |
| HaeIII.FoNC | 5'-CGA GCT AGA GGT ACC TTA TTA ATT ACC TTT ACA AAT TTC CAA TGC AGA TTT TAT-3' (SEQ. ID. No. 3)  |
| HaeIII-Bc   | : CTT AAT AAT TTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG AAT TTA ATT<br>† GCA GGG-3' (SEQ. ID. No. 4)  |
| EDHFR-Fo    | 5'-CGA GCT AGA GGT ACC TTA TTA CCG CCG CTC CAG AAT CTC AAA GCA ATA G-3' (SEQ. ID. No. 5)  |
| EDHFR-Ba    | GAC AAG CTT AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATC AGT CTG<br>‡ TTA GCG GTA G-3' (SEQ. ID. No. 6)                        |
| LMB2-Nest   | 5'-GAA TTG GAT TTA GGT GAC-3' (SEQ. ID. No. 7)  |
| LMB3-Nest   | 5'-CAT GAT TAC GCC AAG CTC-3' (SEQ. ID. No. 8)  |
| LMB2-Biotin | 5'-Biotin-GTA AAA CGA CCG CCA GT-3' (SEQ. ID. No. 9)  |
| LMB3-DIG    | 5'-Digoxigenin-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (SEQ. ID. No. 10)  |
| G3FRAG-Fo   | 5'-GTC TCT GAA TTT ACC GTT CCA G-3' (SEQ. ID. No. 11)   |
| G3FRAG-Ba   | 5'-GAA ACT GTT GAA AGT TGT TTA G-3' (SEQ. ID. No. 12)   |
| P2T7Ba      | 5'-ATT ATA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GTT ATC AGG CAT GCA CC -3' (SEQ. ID. No. 13)   |
| P9Fo        | 5'-CTA GCT CCC ATT AAG GAG-3' (SEQ. ID. No. 14)   |
| LMB2        | 5'-GTA AAA CGA CCG CCA GT-3' (SEQ. ID. No. 15)  |
| LMB3        | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (SEQ. ID. No. 16)  |
| HhaI Fo2S   | 5'-CGA GCT AGA GGT ACC GCG GCC GCT GCG CTT ATT AAT ATG GTT TGA AAT TTA ATG ATG AAC CAA<br>TG-3' (SEQ. ID. No. 17)                         |
| HhaI-Bc     | 5'-GCA TCT GAC AAG CTT AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATT GAA ATA<br>AAA GAT AAA CAG CTC ACA GG-3' (SEQ. ID. No. 18) |
| HaeIII-Fo2s | 5'- CGA GCT AGA GGT ACC GCG GCC GCT GCG CTT ATT AAT TAC CTT TAC AAA TTT CCA ATG CJ<br>TTA T-3' (SEQ. ID. No. 19)                          |
| EcoRI-Bc    | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACA AGC TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TAT TTT TTA 1<br>GGT TTT AAT TAA TGG-3' (SEQ. ID. No. 20)                  |
| EcoRI-Fo    | 5'-GTA AAA CGA CCG CCA GTG AAT TCT TAT TAC TTT TGT AAT CGT TTG TTT TTT ATC-3' (SEQ. ID. No. 21)   |
| EcoRV-Bc    | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACA AGC TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AAT C<br>ATT TTT TAC AAA TG-3' (SEQ. ID. No. 22)                           |

**EcoRV-Fo** 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT TCG ATA TCT TAT TAC TCT TCA ATT ACC AAA ATA TCC CC-3' (SEQ. ID. No. 23)

LMB2-Biotina tiene una biotina en el extremo 5' conectada mediante un brazo espaciador de 16 átomos. LMB3-DIG tiene una digoxigenina en el extremo 5' conectada mediante un brazo espaciador de 12 átomos. Los oligonucleótidos marcados en el extremo 5' con biotina o digoxigenina se adquirieron a Eurogentec.

## Referencias

- Anderson, C.W., Straus, J.W. y Dudock, B. S. (1983) *Methods Enzymol*, 101, 635-44. Anderson, J.E. (1993) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 3, 24-30.
- 5 Ash, M. y Ash, I. (1993) *Handbook of industrial surfactants*. Gower, Aldershot. Baccanari, D.P., Averett, D., Briggs, C. y Burchall, J. (1977) *Biochemistry*, 16, 3566-72. Barany, F. (1991) *PCR Methods Applic.*, 1, 5-16.
- Bass, S., Greene, R. y Wells, J.A. (1990) *Proteins*, 8, 309-14.
- 10 Becher, P. (1957) *Emulsions: theory and practice*. Reinhold, New York.
- Benita, S., Ed. (1996). *Microencapsulation: methods and industrial applications*. Drugs and pharmaceutical sciences. Edited by Swarbrick, J. New York: Marcel Dekker.
- 15 Benner, S.A. (1994) *Trends Biotechnol*, 12, 158-63.
- Berman, J., Eisenberg, S. y Tye, B.K. (1987) *Methods Enzymol*, 155, 528-37.
- 20 Betlach, L., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H. M. & 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, 227-32.
- 25 Bougueleret, L., Schwarrstein, M., Tsugita, A. & Zabeau, M. (1984). Characterization of the genes coding for the EcoRV restriction and modification system of *Escherichia coli*. *Ácido nucleicos Res* 12(8), 3659-76.
- Bru, R. & Walde, P. (1991). Product inhibition of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. *Eur J Biochem* 199(1), 95-103.
- 30 Bru, R. & Walde, P. (1993). Catalytic activity of elastase in reverse micelles. *Biochem Mol Biol Int* 31(4), 685-92.
- Cahill, P., Foster, K. y Mahan, D. E. (1991) *Clin Chem*, 37, 1482-5.
- 35 Chakrabarti, A. C., Breaker, R. R., Joyce, G. F. & Deamer, D. W. (1994). Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles. *J Mol Evol* 39(6), 555-9.
- Chamberlin, M. y Ring, J. (1973) *J Biol Chem*, 248, 2235-2244.
- 40 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. In *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy* (Donbrow, M., ed.), pp. 323-339. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 45 Chapman, K.B. y Szostak, J.W. (1994) *Curr. op. Struct Biol.*, 4, 618-622.
- Chetverin, A.B. y Spirin, A.S. (1995) *Prog Ácido nucleico Res Mol Biol*, 51, 225-70. Clackson, T. y Wells, J.A. (1994) *Trends Biotechnol*, 12, 173-84.
- 50 Creagh, A. L., Prausnitz, J. M. & Blanch, H. W. (1993). Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles. *Enzyme Microb Technol* 15(5), 383-92.
- 55 Cull, M.G., Miller, J.F. y Schatz, P.J. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1865-9. Dickinson, E. (1994) In Wedlock, D.J. (ed.), *Emulsions and droplet size control*. Butterworth-Heine-mann, Oxford, Vol. pp. 191-257.
- Ellington, A.D. y Szostak, J.W. (1990) *Nature*, 346, 81822.
- 60 Ellman, J., Mendel, D., Anthony, C.S., Noren, C.J. y Schultz, P.G. (1991) *Methods Enzymol*, 202, 301-36.
- Fahy, E., Kwok, D.Y. y Gingeras, T.R. (1991) *PCR Methods Appl.* 1, 25-33.

- Fields, S. & Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Finch, C. A. (1993). Encapsulation and controlled release. *Spec. Publ.-R Soc. Chem.* 138, 35. Fisch, I., Kontermann, R.E., Finnern, R., Hartley, O., Soler, G.A., Griffiths, A.D. y Winter, G. (1996) *ProcNatl Acad Sci U S A*, 93,7761 -6.
- 5 Freese, 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, 763-97.
- Green, R. y Szostak, J.W. (1992) *Science*, 258, 1910-5.
- Gregoriadis, G. (1976) *Methods Enzymol*, 44, 21 8-27.
- 15 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, To. y et a.l. (1994) *Embo J*, 13, 3245-60.
- Haber, J., Maslakiewicz, P., Rodakiewicz, N. J. & Walde, P. (1993). Activity and spectroscopic properties of bovine liver catalase in sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate/isooctane reverse micelles. *EurJBiochem* 217(2), 567-73. Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.
- 20 Hochuli, E., Dobeli, H. y Schacher, A. (1987) *J Chromatogr*, 411, 177-84.
- 25 Hoogenboom, H.R, et al., (1991) *Nucl. Acids Res.*, 91, 413334137.
- Hoogenboom, H. R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.
- 30 Hoogenboom, H.R. (1997) *Trends Biotechnol*, 15, 62-70.
- Janda, K.D., Lo, L.-C., Lo, C.-H.L., Sim, M., -M., Wang, R., Wong, C.-H. y Lerna, R.A. (1997) *Science*, 275, 945-948.
- Johannsson, A. (1991) In Price, C.P. y Newman, D.J. (ed.), *Heterogeneous enzyme immunoassays*. Stockton Press, New York, Vol. pp. 295-325.
- 35 Johannsson, A. y Bates, D.L. (1988) In Kemeny, D.M. y Challacombe, S.i. (ed.) , *Amplification by second enzymes*. John Wiley, Chichester, Vol. pp. 85-106.
- 40 Joyce, G.F. (1994) *Curr. op. Structural Biol.*, 4, 331-336.
- Kadir, F.H. y Moore, G.R. (1990) *Febs Lett*, 276, 81-4.
- Kallen, R. G. & Jencks, W. P. (1966). The mechanism of the condensation of formaldehyde with tetrahydrofolic acid. *J. Biol. Chem* 241, 5851-5863.
- 45 Katanaev, V.L., Kumasov, O.V. y Spirin, A.S. (1995) *Febs Lett*, 359, 89-92.
- Keij, J.F., Groenewegen, A.C. & Visser, J.W.M. (1994) High-speed photodamage cell sorting: An evaluation of the ZAPPER protoTIPO. *Methods in cell biology* 42, 371-358.
- 50 Klug, A. (1995) *Ann N Y Acad Sci.* 758,143-60.
- Klug, A. y Schwabe, J.W. (1995) *Faseb T*, 9, 597-604.
- 55 Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Kommer, A. y Spirin, A.S.(1995) *Biochem Cell Biol*, 73, 1217-20.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder,S.D. y Rehrauer, W.M. (1994) *Microbiol Rev*, 58, 401-65.
- 60 Krumdiek, C.L. & Baugh, C.M. (1980) Solid-phase synthesis of pteroylpolyglutamates. *Methods Enzymol.* pp. 524-529

- Kumar, A., Kumar, A. & 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.
- 5 Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. y Hood, L. (1988) *Science*, 241, 1077-80.
- Lesley, S. A., Brow, M. A. & 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), 2632-8.
- 10 Lesley, S.A. (1995) *Methods Mol Biol*, 37, 265-78.
- Lesley, S.A., Brow, M.A. y Burgess, R.R. (1991) *J Biol Chem*, 266,2632-8.
- 15 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 U S A*, 83, 576-80. Lim, F. & Sun, A. M. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210(4472), 908-10.
- 20 Lim, F., Ed. (1984). *Biomedical applications of microencapsulation*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lissant, K.J., ed *Emulsions and emulsion technology*. Surfactant Science New York: Marcel Dekker, 1974.
- Lissant, K.J., ed. *Emulsions and emulsion technology*. Surfactant Science New York: Marcel Dekker, 1974.
- 25 Lissant, K.J., ed. *Emulsions and emulsion technology*. Surfactant Science New York: Marcel Dekker, 1984.
- Low, N.M., Holliger, P.H. y Winter, G. (1996) *J Mol Biol*, 260, 359-68.
- 30 Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. y Wells, J.A. (1991) *Biochemistry*, 30, 10832-8. Luisi, P. L. & 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, 7939-45.
- 35 Magdassi, S., Frenkel, M., Carti, N. y Cazan, R. (1984) 97, 377-379.
- Manley, J.L., Fire, A., Samuels, M. y Sharp, P.A. (1983) *Methods Enzymol*, 101, 568-82. Mao, Q. & Walde, P. (1991). Substrate effects on the enzymatic activity of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. *Biochem Biophys Res Commun* 178(3), 1105-12.
- 40 Mao, Q., Walde, P. & Luisi, P. L. (1992). Kinetic behaviour of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. A stopped-flow study. *Eur J Biochem* 208(1), 165-70.
- 45 Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. y Dower, W.J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9022-6. McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. y Chiswell, DJ. (1990) *Nature*, 348, 552-4. Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. y Green, M.R. (1984) *Ácido nucleicos Res*, 12,703556.
- Mendel, D., Cornish, V.W. y Schultz, P.G. (1995) *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 24, 435-62.
- 50 Menger, F. M. & 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, 281-95.
- Mize, P.D., Hoke, R.A., Linn, C.P., Reardon, J.E. y Schulte, T.H. (1989) *Anal Biochem*, 179,229-35.
- 55 Montigiani, S., Neri, G., Neri, P. y Neri, D. (1996) *J Mol Biol*, 258,6-13.
- Moore, M.J. (1995) *Nature*, 374,766-7.
- 60 New, R. R. C., Ed. (1990). *Liposomes: a practical approach*. The practical approach series. Edited by Rickwood, D. & Hames, B. D. Oxford: Oxford University Press.
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R. I Tomlinson, I.M. , Flynn, G. , Midgley, C., Lane, D. y Winter, G. (1994) *Embo J*, 13, 692-8.

- Oberholzer, T., Albrizio, M. & Luisi, P. L. (1995a). Polymerase chain reaction in liposomes. *Chemistry and Biology* 2, 677-682.
- 5 Oberholzer, T., Wick, R., Luisi, P. L. & Biebricher, C. K. (1995b). Enzymatic RNA replication in self-reproducing vesicles: an approach to a minimal cell. *Biochem Biophys Res Commun* 207(1),250.7.
- Parmley, S.F. y Smith, G.P. (1988) *Gene*, 73,305-18.
- 10 Pelham, H.R. y Jackson, R.J. (1976) *Eur J Biochem*, 67; 247-56.
- Perelson, A.S. y Oster, G.F. (1979) *J Theor Biol*, 81, 64570.
- Perez, G. M., Sanchez, F. A. & Garcia, C. F. (1992). Application of active-phase plot to the kinetic analysis of  
15 lipoygenase in reverse micelles. *Biochem J*.
- Pirrung, M.C. y Huang, C.Y. (1996) *Bioconjug Chem*, 7,31721.
- Posner, B.A., Li, L., Bethell, R., Tsuji, T. y Benkovic, So. (1996) *Biochemistry*, 35, 1653-63.
- 20 Roberts, B.E., Gorecki, M., Mulligan, R.C., Danna, K.J., Rozenblatt, S. y Rich, A. (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1922-6.
- Roberts, J.W. (1969) *Nature*, 224, 1168-74.
- 25 Roberts, R. & Szostak, J. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12297-12302.
- Rosenberg, M., Weissman, S. and decrombrugghe, B. (1975) *J Biol Chem*, 250, 4755-64. Saiki, R.K., Gelfand, D.H.,  
30 Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) *Science*, 239,487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 35 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, New York.
- 40 Sherman, P. (1968) *Emulsion science*. Academic Press, London.
- Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315-7.
- Soumillion, P., Jaspers, L., Bouchet, M., Marchand, B.J., Winter, G. y Fastrez, J. (1994) *J Mol Biol*, 237, 415-22.
- 45 Stemmer, W.P. (1994a) *Nature*, 370, 389-91.
- Stemmer, W.P. (1994b) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91,10747-51.
- Stoflco, H.R., Carr, D.W. y Scott, J.D. (1992) *Febs Lett*, 302, 274-8.
- 50 Sun, A. M., Vasek, I. & Tai, I. (1992). Microencapsulation of living cells and tissues. In *Microencapsulation and nanoparticles in medicine and pharmacy* (Donbrow, M., ed.), pp. 315-322. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sundberg, SA., Barrett, R.W., Pirrung, M., Lu, A.L., Kiangsoontra, B. y Holmes, C.P. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, 117,  
55 12050-12057.
- Tawfik, D. S., Green, B. S., Chap, R., Sela, M. & Eshhar, Z. (1993). catELISA: a facile general route to catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(2), 373-7.
- 60 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, 505-10.
- van Hal, D. A., Bouwstra, J. A. & Junginger, H. E. (1996). Nonionic surfactant vesicles containing estradiol for topical application. In *Microencapsulation: methods and industrial applications* (Benita, S., ed.), pp. 329-347. Marcel Dekker, New York.
- 5
- Walde, P., Goto, A., Monnard, P.-A., Wessicken, M. & 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. & Luisi, P. L. (1993). Spectroscopic and kinetic studies of lipases solubilized in reverse micelles. *Biochemistry* 32(15), 4029-34.
- Walde, P., Peng, Q., Fadnavis, N. W., Battistel, E. & Luisi, P. L. (1988). Structure and activity of trypsin in reverse micelles. *Eur J Biochem* 173(2), 401-9.
- 15
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. y Malinowski, D.P. (1992) *Ácido nucleicos Res*, 20, 1691-6.
- Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. y Roeder, R.G. (1979) *Cell*, 18, 469-84.
- 20
- Whateley, T. L. (1996). Microcapsule: preparation by interfacial polymerisation and interfacial complexation and their applications. In *Microencapsulation: methods and industrial applications* (Benita, S., ed.), pp. 349-375. Marcel Dekker, New York.
- 25
- Wick, R. & Luisi, P. L. (1996). Enzyme-containing liposomes can endogenously produce membrane-constituting lipids. *Chem Biol* 3(4), 277-85.
- Widersten, M. y Mannervik, B. (1995) *J Mol Biol*, 250, 115-22.
- 30
- Williams, J.W., Morrison, J.F. y Duggleby, R.G. (1979) *Biochemistry*, 18, 2567-73. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R. (1994) *Annu Rev Immunol*, 12, 433-55.
- Wyatt, J.R1 Chastain, M. y Puglisi, J.D. (1991) *Biotechniques*, 11, 764-9.
- 35
- Yamagishi, J., Kawashima, H., Matsuo, N., Ohue, M., Yamayoshi, M., Fukui, T., Kotani, H., Furuta, R., Nakano, K. y Yamada, M. (1990) *Protein Eng*, 3, 713-9.
- Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., Gonzalez, FA., Pannell, R., Neuberger, M.S. y Milstein, C. (1995) *Nature*, 376, 225-9.
- 40
- 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, 4478-82.
- 45
- Zaug, A.J. y Cech, T.R. (1986) *Science*, 231, 470-5.
- Zaug, A.J., Been, M.D. y Cech, T.R. (1986) *Nature*, 324, 429-33.
- 50
- Zubay, G. (1973) *Annu Rev Genet*, 7, 267-87.
- Zubay, G. (1980) *Methods Enzymol*, 65, 856-77.

55

Listado de Secuencias

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: MEDICAL RESEARCH COUNCIL  
 (B) CALLE: 20 PARK CRESCENT  
 (C) CIUDAD: LONDRES  
 10 (E) PAÍS: GB  
 (F) CÓGIDO POSTAL (ZIP): WIN 4AL
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: MÉTODO DE CLASIFICACIÓN IN VITRO
- 15 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 23
- (iv) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR
- 20 (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible  
 (B) ORDENADOR: IBM compatible con PC  
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 60 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 30 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 35 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

AGCTTGCATG CCTGCGGTAC CGGCCATGCG CATGGCCTAG CGCATGCGGC CGCTAGCGCG 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 60 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 50 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 55 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

AATTCGCGCT AGCGGCCGCA TGCGCTAGGC CATGCGCATG GCCGGTACCG CAGGCATGCA 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 54 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

15 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

20 CGAGCTAGAG GTACCTTATT AATTACCTTT ACAAATTTCC AATGCAGATT TTAT

54

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 84 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

35 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

40 GCATCTGACA AGCTTAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TATGAATTA 60

ATTAGTCTTT TTCAGGTGC AGGG 84

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 49 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 50 (D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

55 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

CGAGCTAGAG GTACCTTATT ACCGCCGCTC CAGAATCTCA AAGCAATAG

49

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 82 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) STRANDEDNESS: única
- (D) TOPOLOGÍA: linear

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

15

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

**GCATCTGACA AGCTTAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATACA TATGATCAGT 60**

**CTGATTGCGG CGTTAGCGGT AG 82**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) STRANDEDNESS: única
- (D) TOPOLOGÍA: linear

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

35

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

GAATTGGATT TAGGTGAC

18

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) STRANDEDNESS: única
- (D) TOPOLOGÍA: linear

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

55

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

CATGATTACG CCAAGCTC

18

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 17 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc - "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 17 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

45 CAGGAAACAG CTATGAC

17

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 22 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

60 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

GTCTCTGAAT TTACCGTTCC AG

22

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 22 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

GAAACTGTTG AAAGTTGTTT AG

22

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 44 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

45 ATTATAATAC GACTCACTAT AGGGAGAGTT ATCAGGCATG CACC

44

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50 (A) LONGITUD: 18 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

60 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

CTAGCTCCCA TTAAGGAG

18

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 17 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 18 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

45 CAGGAAACAG CTATGAC

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 65 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

60 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

**CGAGCTAGAG GTACCGCGGC CGCTGCGCTT ATTAATATGG TTTGAAATTT AATGATGAAC 60**

**CAATG 65**

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 83 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

**GCATCTGACA AGCTTAATAA TTTTGTTTAA CTTAAGAAG GAGATATACA TATGATTGAA 60**

**ATAAAAGATA AACAGCTCAC AGG 83**

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 67 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

**CGAGCTAGAG GTACCGCGGC CGCTGCGCTT ATTAATTACC TTTACAAATT TCCAATGCAG 60**

**45 ATTTTAT 67**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50 (A) LONGITUD: 78 pares de base  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) STRANDEDNESS: única  
 (D) TOPOLOGÍA: linear

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

5 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

**CAGGAAACAG CTATGACAAG CTTAATACGA CTCACTATAG GGAGATATTT TTTATTTTAA 60**

**TAAGGTTTTA ATTAATGG 78**

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 54 pares de base  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) STRANDEDNESS: única  
(D) TOPOLOGÍA: linear

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

25

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

30 GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTCTTATTAC TTTTGTAATC GTTTGTTTTT TATC 54

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ-ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 77 pares de base  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) STRANDEDNESS: única  
(D) TOPOLOGÍA: linear

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

45

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

50

**CAGGAAACAG CTATGACAAG CTTAATACGA CTCACTATAG GGAGAAATGG GTTTCITTGG 60**

**CATATTTTTT ACAAATG 77**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 23:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 59 pares de base  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) STRANDEDNESS: única

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

5

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO"

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTCGATATCT TATTACTCTT CAATTACCAA AATATCCCC

59

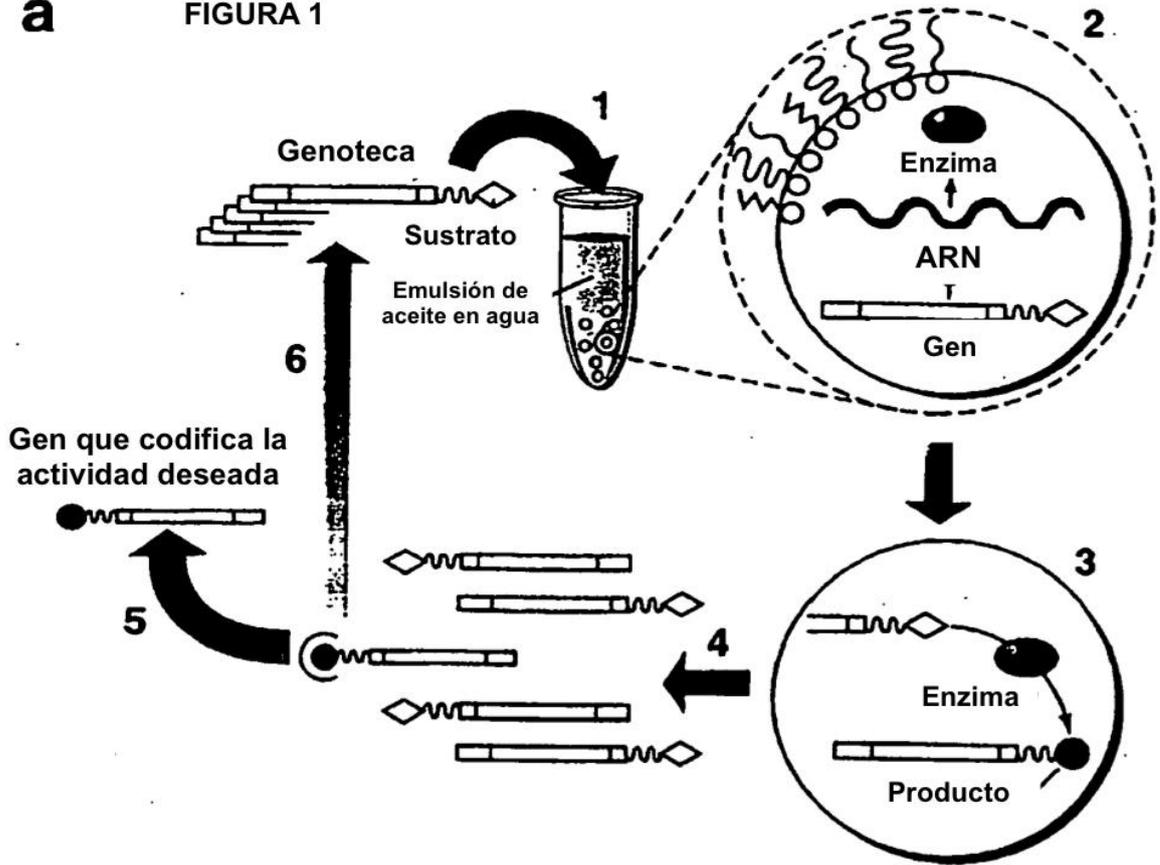
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para incrementar la concentración de una molécula de ácido nucleico, en donde dicho procedimiento comprende:
- 5 (a) la formación de microcápsulas acuosas a partir de una emulsión de agua en aceite, en donde muchas de las microcápsulas contienen una molécula de ácido nucleico y una solución acuosa que comprende los componentes necesarios para la amplificación del ácido nucleico; y
- (b) la amplificación de la molécula de ácido nucleico en las microcápsulas para formar más copias amplificadas de dicha molécula de ácido nucleico,
- 10 en donde las microcápsulas compartimentan una genoteca de moléculas de ácido nucleico.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende el acoplamiento de dicho ácido nucleico a un soporte en fase sólida.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho soporte en fase sólida comprende una perla.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha perla es una perla de poliestireno o una perla magnética.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde dicha perla comprende un revestimiento seleccionado entre avidina y estreptavidina.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una etiqueta de biotina.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha amplificación de ácido nucleico se realiza con ARN polimerasa, amplificación con la replicasa de Q $\beta$ , reacción en cadena de la ligasa, replicación de secuencia automantenida o amplificación por desplazamiento de hebra.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha amplificación de ácido nucleico se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- 25 9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha emulsión contiene al menos un estabilizante de emulsión.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho estabilizante de emulsión es un tensioactivo no iónico.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho estabilizante de emulsión se selecciona entre monooleato de sorbitán y monooleato de polioxietilensorbitán.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el estabilizante de emulsión es un tensioactivo aniónico.
- 35 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el estabilizante de emulsión se selecciona entre colato de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio y desoxicolato de sodio.
14. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la emulsión es termoestable.
- 40 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho soporte en fase sólida es una perla, dicha amplificación de ácido nucleico se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y la emulsión es termoestable.
16. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada una de las muchas microcápsulas formadas contiene de media una o menos de una molécula de ácido nucleico.
17. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde cada una de las muchas microcápsulas formadas contiene de media entre 5 y 1000 moléculas de ácido nucleico.
- 45 18. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas microcápsulas comprenden una fase interna acuosa suspendida en forma de gotitas independientes en una fase externa hidrófoba.

19. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o 18, en donde hay de media un único elemento genético o menos por microcápsula.

20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en donde cada microcápsula encapsula un ácido nucleico diferente procedente de la genoteca.

**a** FIGURA 1



**b**

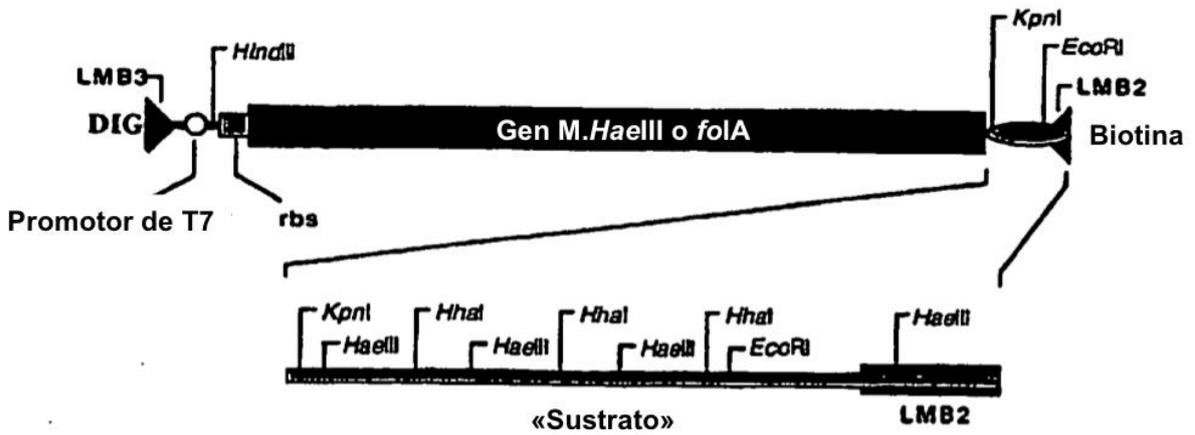


FIGURA 2

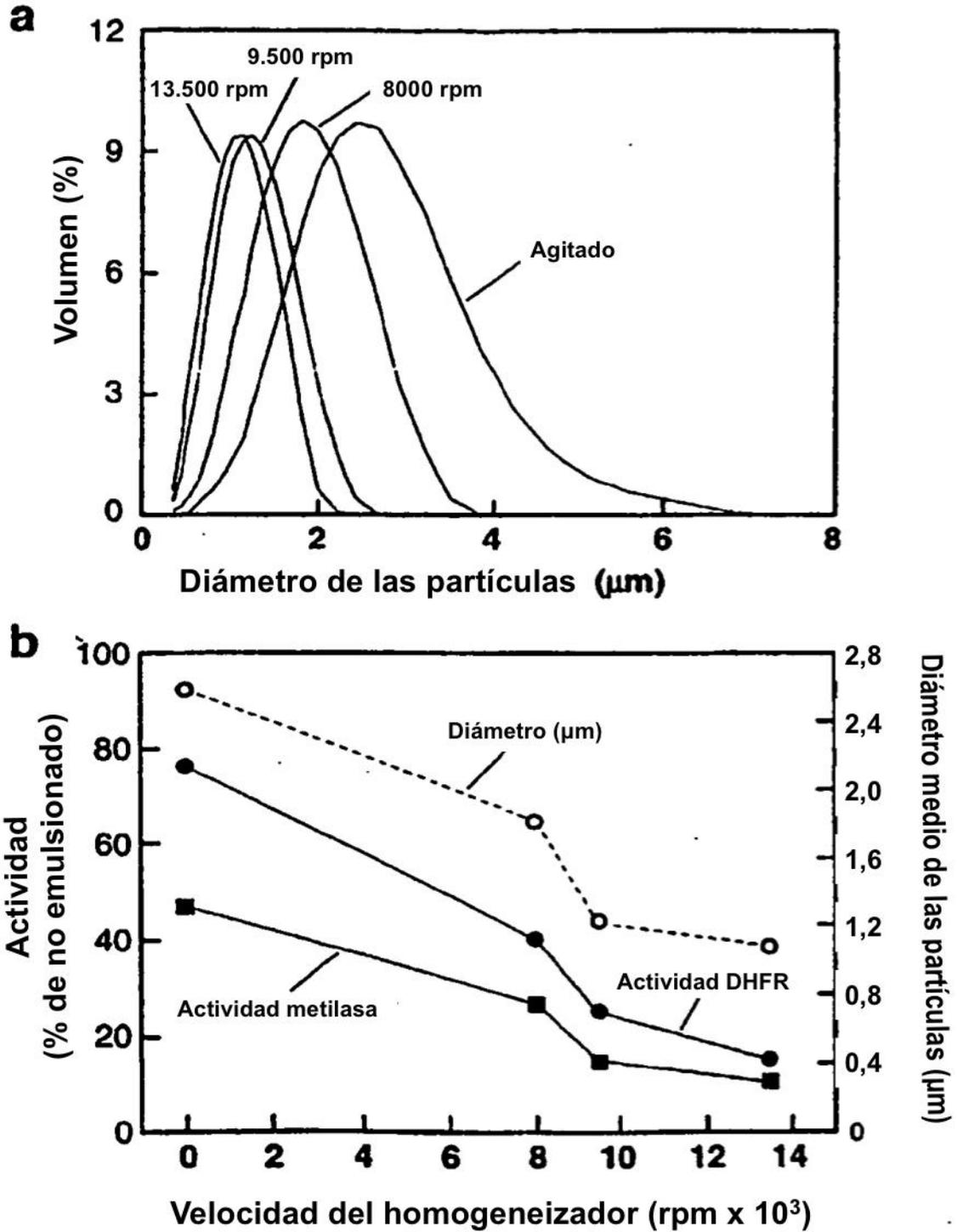


FIGURA 3

