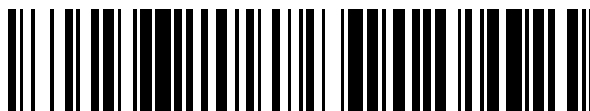


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 691**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2010 PCT/KR2010/003674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10143871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2010 E 10786354 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2465946**

54 Título: **Método para cribar y cuantificar diversas actividades enzimáticas usando un sistema genético de cribado de enzimas**

30 Prioridad:

08.06.2009 KR 20090050596
23.12.2009 KR 20090130204

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2017

73 Titular/es:

**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE
AND BIOTECHNOLOGY (100.0%)**
52, Eoeun-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-333, KR

72 Inventor/es:

LEE, SEUNG GOO;
RHA, EUGENE;
CHOI, SU LIM;
SONG, JAE JUN;
CHOI, JONG HYUN y
KIM, HEE SIK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 608 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para cribar y cuantificar diversas actividades enzimáticas usando un sistema genético de cribado de enzimas

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a un método para cribar y cuantificar diversas actividades enzimáticas y a un método para cribar una actividad enzimática derivada de una biblioteca metagenómica basada en el mismo en un modo de alto rendimiento. Más específicamente, la divulgación se refiere a un método para rastrear y cuantificar diversas actividades enzimáticas usando un circuito artificial para identificar compuestos fenólicos y a un método para cribar una actividad enzimática buscada derivada de un metagenoma en un modo de alto rendimiento, asegurando se ese modo genes enzimáticos buscados.

10 Técnica anterior

15 Los biocatalizadores son reconocidos como materiales clave para "el desarrollo económico sostenible", incluyendo una tecnología limpia para la producción de energía, materiales industriales, etc., y se han hecho diversos esfuerzos para cribar enzimas que tienen nueva reactividad, especificidad y estabilidad químicas. Se conocen métodos para el cribado de alto rendimiento de genes de resistencia a antibióticos, enzimas esenciales para el crecimiento, varias enzimas industriales (p. ej., amilasa, lipasa, proteasa, etc.) y similares sobre medios sólidos, pero la mayoría de las funciones enzimáticas dependen de la tecnología para el análisis de la actividad, lo que requiere mucho tiempo y coste.

20 En los últimos años, han surgido como estrategias importantes en la tecnología de la bioingeniería estudios sobre la aplicación de la tecnología de evolución dirigida para asegurar nuevos recursos genéticos procedentes de genomas o metagenomas microbianos o mejorar la actividad de genes existentes para desarrollar biocatalizadores muy útiles. Así, existe una necesidad de desarrollar una nueva tecnología de cribado de alta sensibilidad para la detección con alto rendimiento de las actividades de cantidades muy pequeñas de enzimas .

25 Métodos para obtener nuevos genes enzimáticos a partir de diversas fuentes genéticas, tales como genomas microbianos y ADN ambiental (metagenoma), incluyen un método de cribado basado en la secuencia que comprende someter a secuenciación ADN, realizar una reacción de PCR y obtener el gen amplificado. La capacidad de utilización de este método se incrementa día a día ya que la información del genoma se incrementa rápidamente, y tiene la ventaja de solo se pueden seleccionar específicamente genes deseados. Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que, debido a que solo se puede aplicar cuando se conoce la información exacta acerca de las secuencias nucleotídicas de los genes diana, la aplicación del mismo se limita a una porción de las fuentes genéticas.

35 Además, también se usa ampliamente un método de cribado basado en la función que selecciona genes basándose en la función del gen, esto es, la actividad enzimática. Para cribar la actividad enzimática mediante este método, se han usado ampliamente métodos para aislar microorganismos directamente de muestras ambientales, incluyendo muestras procedentes del suelo, ríos, aguas residuales industriales, agua marina y bosques. Sin embargo, la cantidad de especie microbiana que se puede cultivar en laboratorios es tan pequeño como menos de 1% los microorganismos presentes en la naturaleza. En los últimos años, se ha intentado activamente una estrategia para construir fuentes genéticas como bibliotecas metagenómicas al aislar ADN directamente de muestras ambientales sin cultivar microorganismos. Así, existe un interés creciente en desarrollar una tecnología de cribado para detectar industrialmente actividades enzimáticas útiles directamente a partir de bibliotecas metagenómicas.

45 Mientras tanto, las principales tecnologías para el análisis con alto rendimiento de las actividades enzimáticas incluyen: 1) tecnología de ensayos múltiples automatizados utilizando placas con pocillos; 2) un método para observar el desarrollo de color o una zona transparente (halo) sobre un medio sólido; y 3) un método de aislamiento selectivo que utiliza microorganismos nutricionalmente deficientes. Estos métodos se basan en la actividad real de una enzima, y así tienen la ventaja de que pueden seleccionar precisamente un gen de una función deseada. Sin embargo, debido a que cada tecnología de detección se requiere para cada actividad enzimática, el uso general de estos métodos es limitado. Adicionalmente, los efectos de estos métodos se reducen más cuando la transcripción, la traducción o la expresión de un gen extraño en células hospedadoras es baja o surgen problemas como el plegamiento o la secreción de proteínas. En efecto, en el caso de nuevas enzimas derivadas de fuentes genéticas, tales como nuevos genomas y metagenomas microbianos, que tienen una gran diversidad genética y cuyas características genéticas se desconocen, sus niveles de expresión en microorganismos recombinantes son muy bajos, y así es muy difícil aplicar el método de ensayo de alto rendimientos anterior a estas enzimas. Así, continúa la necesidad de desarrollar un nuevo principio de cribado de alto rendimiento según el cual incluso la actividad de una enzima que se exprese a un nivel muy bajo se pueda detectar con alta sensibilidad.

60 En este contexto, se presentó y recibió atención un estudio sobre circuitería genética artificial para detectar la actividad de enzimas tales como proteasa intracelular mediante tecnología de manipulación genética basada en el

principio de la activación de la transcripción en un sistema de 3 híbridos de levadura. Además, se está estudiando activamente una tecnología para detectar actividades enzimáticas usando productos resultantes de la reacción de enzimas extrañas como nutrientes para células o detectar las actividades enzimáticas de genes extraños en *E. coli* recombinante al introducir la *E. coli* recombinante con proteínas reguladoras de la transcripción procedentes de otros microorganismos, al rediseñar rutas metabólicas microbianas. Además, se están realizando activamente esfuerzos para desarrollar una tecnología de manipulación de proteínas para modificar la especificidad para el sustrato de proteínas reguladoras. Por ejemplo, también se estudió modificar la especificidad para el sustrato de la proteína reguladora HpbR, que se une a 2-hidroxibifenilo (2-HBP), a fin de reconocer específicamente 2-clorobifenilo (2-CBP) que tiene cloro- en lugar de hidroxio- (Beggah y cols., (2008) *Microb. Biotechnol.* 1(1): 68 78).

Así, la detección de los productos de reacciones enzimáticas usando proteínas reguladoras se puede usar como tecnologías innovadoras para cribar nuevas enzimas. Sin embargo, tales tecnologías son meramente tecnologías para cribar un pequeño número de actividades enzimáticas específicas para las que se elucidan tales productos de sustrato y proteínas reguladoras, y estas tecnologías no pueden ser sistemas universales que se puedan aplicar a las diversas actividades enzimáticas.

Otras tecnologías para cribar nuevas enzimas incluyen SIGEX (cribado de la expresión génica inducido por sustrato) presentado por el grupo de investigación de Watanabe en 2005. Esta tecnología se basa en promotores del cribado cuya actividad de transcripción es inducida por sustratos añadidos. Así, no existe una tecnología para cribar directamente la actividad enzimática, sino que existe una tecnología para detectar genes indirectamente. A saber, funciones enzimáticas que no están asociadas con la activación de la transcripción no son detectadas mediante esta tecnología. En esta tecnología, existe una ventaja ya que, debido a que se puede usar análisis por FACS, se pueden tratar grandes cantidades de muestras en un tiempo corto. Sin embargo, esta tecnología es difícil de aplicar a una biblioteca metagenómica que contiene genes grandes que tienen un tamaño de 20-30 kb, y no puede aparecer la activación de GFP en la dirección de los genes en una biblioteca (Uchiyama y cols., (2005) *Nat. Biotech.* 23: 88-93).

Mientras tanto, se han conocidos estudios sobre una tecnología para detectar compuestos fenólicos (Registro de Patente Coreana Nº 10-0464068), pero todavía no se ha presentados un estudio sobre el uso de esta tecnología para detectar actividades enzimáticas.

Los presentes inventores han efectuado estudios sobre un métodos capaz de detectar diversas actividades enzimáticas. Como resultado, basándose en el hecho de que diversos compuestos de descarga de fenol capaces de liberar fenol se pueden usar como sustratos en muchas reacciones enzimáticas, los presentes inventores han construido circuitos genéticos artificiales que detectan fenoles y han encontrado que el uso de los circuitos genéticos artificiales permite la medida de actividades cuantitativas de genes indicadores, tales como genes indicadores fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos, cuya expresión era inducida. Así, los presentes inventores han confirmado la eficacia y la utilidad general de esta tecnología al recoger y aislar genes que tienen actividades enzimáticas de tirosina fenol-liasa y fosfatasa alcalina de una biblioteca metagenómica mediante cribado de alto rendimiento (millones/día) usando circuitos genéticos, completando de ese modo la presente invención.

40 **Divulgación de la invención**

La presente invención se refiere a lo siguiente:

1. Un método para cribar una actividad enzimática buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético (i) un gen que codifica una proteína reguladora (proteína reguladora), (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos, (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo;

(b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

(c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

5 (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida por la proteína reguladora que identifica el compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica.

2. Un método para cribar la actividad enzimática buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

10 (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y
15 (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo;

(b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

20 (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

25 (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida por la proteína reguladora que identifica el compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora.

3. Un método para cuantificar la actividad enzimática buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

30 (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar
35 la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

40 (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

45 (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora.

4. Un método para cuantificar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

5 (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

15 (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

20 (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora.

5. Un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de la enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar una biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural;

25 (b) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

30 en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo;

35 (c) introducir la biblioteca metagenómica y el circuito genético artificial en microorganismos hospedadores para construir una biblioteca de microorganismos transformados;

(d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar;

40 (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y

(f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

45 6. Un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de la enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) proporcionar una biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural;
- (b) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,
- 5 en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo; (c) introducir la biblioteca metagenómica e los microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma el circuito genético artificial para construir una biblioteca de microorganismos transformados;
- 10 (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar;
- (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto
- 15 fenólico mediante la reacción enzimática; y
- (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.
7. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que las enzimas se seleccionan del grupo que consiste en α -glucosidasa, β -glucosidasa, celulasa, glucosilceramidasa, fosfatasa, fitasa,
- 25 esterasa, lipasa, uretanasa, amidasa, peptidasa, proteinasa, oxidorreductasa, fenol-liasa, dihalogenasa, isomerasa, monooxigenasa y dioxigenasa.
8. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto fenólico es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-clorofenol, m-clorofenol, p-clorofenol, o-nitrofenol, m-nitrofenol, p-nitrofenol, ácido salicílico, 2-aminofenol, 2-metoxifenol, catecol, resorcinol, 3-metilcatecol, 2,4-dimetilfenol, 2,5-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, 2,3-dimetilfenol, 3,5-dimetilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,5-diclorofenol, 2,3-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 3,4-diclorofenol, 3,5-diclorofenol, 2,4-dinitrofenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 2-etilfenol, 3-etilfenol, 2-fluorofenol, 2-yodofenol y benceno.
- 30 9. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto de descarga de fenol se selecciona del grupo que consiste en ésteres que contienen un grupo fenol; éteres que contienen un grupo fenol; glucósidos que contienen un grupo fenol; fosfoésteres que contienen un grupo fenol; derivados fenólicos que contienen un grupo alquilo, hidroxilo, carboxilo, amino, tiol, amida, sulfuro o halógeno en la posición orto, meta o para; y compuestos de anillo bencénico.
- 35 10. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que la proteína reguladora que reconoce un compuesto fenólico es o su variante.
- 40 11. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, una levadura, una célula vegetal o una célula animal.
12. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia del RBS de *E. coli* RBS se inserta en el circuito genético artificial para facilitar la expresión del gen indicador en *E. coli*.
- 45 13. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el gen indicador es un indicador doble que consiste en un gen tanto de proteína fluorescente como de resistencia a antibiótico.
14. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que el circuito genético contiene además un gen suicida.

15. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que el tratamiento del compuesto de descarga de fenol se realiza cuando el valor del crecimiento celular (OD_{600}/ml) de los microorganismos transformados alcanzaba aproximadamente 1,5-4.

5 16. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que la reacción enzimática se realiza durante 14-16 horas después del tratamiento del compuesto de descarga de fenol.

17. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que la etapa de tratamiento con el compuesto de descarga de fenol consiste en las etapas de: (i) recoger un microorganismo desarrollado en medio nutritivo; y (ii) tratar el microorganismo recogido con el compuesto de descarga de fenol en medio mínimo.

10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para cribar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) bien proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador, o bien proporcionar microorganismos que contienen el circuito genético en su ADN cromosómico o citoplasma; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

25 Otro objetivos es proporcionar un método para cuantificar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) bien proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador, o bien proporcionar microorganismos que contienen el circuito genético en su ADN cromosómico o citoplasma; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

45 Otro objetivo más es proporcionar un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de una enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural; (b) bien proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador, o bien microorganismos que contienen el circuito genético en su ADN cromosómico o citoplasma; (c) introducir la biblioteca metagenómica y el circuito genético artificial en microorganismos hospedadores para construir una biblioteca de microorganismos transformados; (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

Para alcanzar los objetivos anteriores, la presente divulgación proporciona un método para cribar la actividad enzimática buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

La presente divulgación también proporciona un método para cribar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

La presente divulgación también proporciona un método para cuantificar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

La presente divulgación también proporciona un método para cuantificar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

La presente divulgación también proporciona un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de una enzima procedente de una biblioteca metagenómica,

comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar a biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural; (b) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (c) introducir la biblioteca metagenómica y el circuito genético artificial en microorganismos hospedadores para construir una biblioteca de microorganismos transformados; (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación

La presente divulgación también proporciona un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de una enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar a biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural; (b) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (c) introducir la biblioteca metagenómica en los microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma el circuito genético artificial para construir una biblioteca de microorganismos transformados; (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1(A) muestra un principio (sistema de cribado genético de enzimas (GESS)) para detectar diversos tipos de actividades enzimáticas usando un circuito genético artificial según la presente invención y la FIG. 1B muestra esquemáticamente un vector de GESS (pGESS) que emplea el circuito genético artificial según la presente invención y es una vista ampliada de la región reguladora de la expresión génica del vector. En la FIG. 1, TRF: un factor de regulación de la transcripción que significa una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico según la presente invención; OpR: una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico TRF para inducir un gen indicador aguas abajo; Px: un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico; y P_R: un promotor que regula la expresión del gen indicador.

La FIG. 2 en una vista esquemática que muestra el cribado de alto rendimiento de una biblioteca metagenómica que usa un circuito genético que incluye un indicador de proteína fluorescente o proteína de resistencia a antibiótico, en donde la FIG. 2A muestra el cribado de alto rendimiento de la biblioteca metagenómica que usa el indicador de proteína fluorescente y la FIG. 2B muestra el cribado de alto rendimiento de la biblioteca metagenómica que usa el indicador de proteína de resistencia a antibiótico.

La FIG. 3 muestra un método que comprende retirar un circuito genético artificial de una cepa microbiana seleccionada y recoger un vector fosmídico puro que contiene un gen útil, en donde la FIG. 3A muestra un método de recogida mediante tratamiento con enzimas de restricción, la FIG. 3B muestra un método para usar microorganismos que tienen introducido en los mismos un circuito genético artificial y la FIG. 3C muestra un método de recogida después de un procedimiento de curado realizado al introducir un gen suicida en el circuito genético artificial.

La FIG. 4 muestra un método para realizar un cribado de alto rendimiento de un gen enzimáticamente activo desde una biblioteca metagenómica usando GESS (sistema genético de cribado de enzimas).

La FIG. 5 muestra un procedimiento de construcción de pGESS-EGFP(I) que contiene una proteína de fluorescencia (EGFP) como un indicador.

- 5 La FIG. 6 muestra un procedimiento de construcción de pGESS-EGFP(II), que contiene una proteína de fluorescencia (EGFP) como un indicador y tiene el RBS y el terminador de la transcripción de T7 introducidos en un circuito genético.

La FIG. 7 muestra un procedimiento de construcción de pGESS-Cm(II), pGESS-Tc(II), pGESS-Km(II), que contienen un antibiótico (cloranfenicol, tetraciclina o kanamicina) como un indicador.

- 10 La FIG. 8 muestra un procedimiento de construcción de pGESS-EGFP(III) sustituido con dmpR(E135K) mutante en lugar de dmpR de pGESS-EGFP(II).

La FIG. 9 muestra los resultados de examinar la reacción de pGESS en diversas cepas de *E. coli* (DH5a, EPI300, JM109(DE3), BL21, BL21(DE3)) a fin de construir un hospedador de *E. coli* óptimo para el sistema GESS, en la que la FIG. 9A es una imagen que muestra el grado de expresión de fluorescencia sobre un medio sólido que contiene fenol, la FIG. 9B es una imagen que muestra el grado de expresión de fluorescencia en un medio líquido que contiene fenol y la FIG. 9C muestra el efecto del tiempo de adición de fenol sobre el crecimiento celular.

- 15

La FIG. 10 muestra la capacidad de pGESS-EGFP para cuantificar fenol, en la que la FIG. 10A muestra que la intensidad de fluorescencia se incrementa dependientemente de la concentración de fenol sobre medio sólido, la FIG. 10B muestra que la intensidad de fluorescencia se incrementa dependientemente de la concentración de fenol en medio líquido, la FIG. 10C muestra los resultados de examinar la dependencia con el fenol de pGESS usando FACS y la FIG. 10D muestra números de colonias que indican la dependencia con el fenol de pGESS que contiene una proteína de resistencia a antibiótico como un indicador.

- 20

La FIG. 11 muestra los resultados de medir la capacidad de identificación de pGESS para detectar diversos compuestos fenólicos, en la que la FIG. 11A muestra respuestas obtenidas cuando se usa una proteína de fluorescencia como un indicador, la FIG. 11B muestra respuestas obtenidas cuando se usa una proteína de resistencia a cloranfenicol como un indicador y la FIG. 11C muestra información acerca de compuestos fenólicos usados en los experimentos.

- 25

La FIG. 12 muestra los resultados de examinar respuestas cuantitativas según las concentraciones de diversos compuestos fenólicos, en la que la FIG. 12A muestra respuestas obtenidas cuando se usa una proteína de fluorescencia como un indicador y la FIG. 12B muestra respuestas obtenidas cuando se usa una proteína de resistencia a antibiótico como un indicador.

- 30

La FIG. 13 muestra los resultados de examinar el contenido de fenol de agua residual usando pGESS, la FIG. 13A muestra los resultados de analizar el agua residual usando pGESS, la FIG. 13B muestra la respuesta de pGESS a fenol y la FIG. 13C muestra los resultados del análisis por GC/MASAS de agua residual.

- 35 La FIG. 14 muestra los resultados de detectar las actividades de diversas enzimas usando pGESS, en la que la FIG. 14A muestra los resultados de detectar la actividad enzimática de β -galactosidasa derivada de *E. coli* β -galactosidasa, FIG. 14B muestra los resultados de detectar la actividad enzimática de tirosina-fenol-liasa derivada de *Citrobacter freundii* y la FIG. 14C muestra los resultados de detectar la actividad enzimática de metil-parationa hidrolasa derivada de *Pseudomonas* sp.

- 40 La FIG. 15 muestra los resultados de detectar la actividad de tirosina fenol-liasa (TPL) usando diversos indicadores, en la que la FIG. 15A muestra los resultados de detectar la actividad de TPL sobre medio sólido usando un indicador de la fluorescencia, la FIG. 15B muestra los resultados de detectar la actividad de TPL sobre medio líquido usando un indicador de la fluorescencia y la FIG. 15C muestra los resultados de detectar la actividad de TPL usando una proteína de resistencia a antibiótico (tetraciclina).

- 45 La FIG. 16 muestra los resultados de medir cuantitativamente la diferencia en la actividad entre enzimas usando pGESS, la FIG. 16A muestra los resultados de medir las actividades enzimáticas de TPL procedente de *Citrobacter freundii* y de *Symbiobacterium toebii* usando pGESS y la FIG. 16B muestra los resultados del análisis de HPLC de fenol producido después de someter estas cepas a una reacción enzimática.

La FIG. 17 muestra los resultados de examinar el efecto de componentes del medio sobre la capacidad de pGESS para detectar fenol, en la que la FIG. 17A muestra la diferencia en la velocidad de crecimiento entre medios LB y M9, la FIG. 17B muestra la diferencia en la reactividad entre circuitos genéticos artificiales.

5 La FIG. 18 muestra los resultados de examinar los efectos de fuentes de carbono de medio M9 a fin de mejorar la capacidad de pGESS para detectar fenol, en la que la FIG. 18A muestra la diferencia en la velocidad de crecimiento entre glucosa, glicerol, succinato y acetato como fuentes de carbono y la FIG. 18B muestra la diferencia en la reactividad en circuitos genéticos artificiales.

10 La FIG. 19 muestra los resultados de intentar la separación entre una etapa de crecimiento celular y una etapa de activación del circuito genético durante la medida de la actividad enzimática a fin de optimizar una reacción para identificar la actividad enzimática, en la que la FIG. 19A muestra los resultados de cultivar cada biblioteca usando medio LB y examinar el punto temporal en el que cada biblioteca se mueve desde la etapa de crecimiento a la etapa de activación; la FIG. 19B muestra los resultados de examinar el tiempo empleado para la activación del circuito genético para alcanzar el máximo después de la etapa de crecimiento celular; la FIG. 19C muestra resultados de FACS que indican que la sensibilidad del circuito genético al fenol se incrementaba como resultado de intentar la separación de la etapa de activación del circuito genético; y la FIG. 19D es un diagrama gráfico que muestra los resultados de cuantificar la sensibilidad del circuito genético al fenol.

15 La FIG. 20 muestra los resultados de mejorar la sensibilidad al fenol y la especificidad de reconocimiento al modificar circuitos genéticos, en la que la FIG. 20A muestra mejoras en las sensibilidades de pGESS-EGFP (II) y pGESS-EGFP(III) a fenol y la FIG. 20B muestra mejoras en las especificidades de reconocimiento de pGESS-EGFP (III) para 2-nitrofenol y 4-nitrofenol así como fenol.

20 La FIG. 21 muestra los resultados de realizar un cribado de alto rendimiento de tirosina fenol-liasa a partir de una biblioteca genómica procedente de *Citrobacter freundii* usando el sistema GESS, en la que la FIG. 21A muestra los resultados de cribar colonias que muestran la respuesta (fluorescencia) del circuito genético después de sembrar una biblioteca sobre medio sólido que contiene tirosina y la FIG. 21B muestra los resultados de una reacción en cadena de la polimerasa realizada para determinar si la tirosina fenol-liasa está contenida en las colonias cribadas.

25 La FIG. 22 muestra los resultados de construir una fosmidoteca metagenómica, en la que la FIG. 22A muestra un método para construir una biblioteca metagenómica al extraer ADN de una comunidad microbiana y la FIG. 22B muestra una imagen de identificación del tamaño de un gen insertado en el vector fosmídico al tratar la biblioteca metagenómica con enzimas de restricción.

30 La FIG. 23 muestra un procedimiento para llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de fosfatasa alcalina a partir de una biblioteca metagenómica usando el sistema GESS.

La FIG. 24 es un árbol de distancias que muestra secuencias altamente homólogas después de la búsqueda por blast basada en la secuencia de aminoácidos de nueva fosfatasa alcalina (Pho [KRIBB]: nueva fosfatasa alcalina cribada según la presente invención).

35 La FIG. 25 muestra los resultados de examinar las propiedades de nueva fosfatasa alcalina a diversos pH y temperaturas, en la que la FIG. 25A es una imagen que muestra el pH óptimo que indica la actividad más alta; la FIG. 25B es una imagen que muestra la temperatura óptima que indica la actividad más alta; y la FIG. 25C muestra los grados de inactivación térmica de enzimas.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

40 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto normal en la especialidad de la que trata la invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente es muy conocida y se emplea comúnmente en la especialidad.

45 La presente invención se dirige a una tecnología (sistema genético de cribado de enzimas; GESS) para realizar un cribado de alto rendimiento de diversas actividades enzimáticas con alta sensibilidad usando circuitos genéticos artificiales.

50 El fenol está contenido en diversas fuentes de hidrocarburos, incluyendo petróleo, hulla, lignina y similares y también está contenido en compuestos sintetizados artificialmente. Así, las reacciones enzimáticas que implican residuos fenólicos como sustratos o productos de reacción son muy diversos y, por ejemplo, las especies enzimáticas que liberan compuestos fenólicos en las reacciones de 40.000 enzimas listadas en la base de datos de Brenda (www.brenda-enzymes.info) que proporcionan información asociada con una tipo amplio de enzimas alcanzaban

aproximadamente 2.000 especies (aproximadamente 5% de la lista total) como resultado de la búsqueda. La presente divulgación se refiere a la tecnología que comprende realizar reacciones enzimáticas usando diversos compuestos que tienen un grupo fenol unido a los mismos como sustratos sintéticos y detectar el fenol liberado mediante un método de manipulación genética. Así, la tecnología de la presente divulgación es una tecnología de cribado de enzimas de uso universal que se puede aplicar generalmente a una gama muy amplia de enzimas. Los compuestos de *o/p*-nitrofenol son incoloros cuando se acoplan con otros compuestos orgánicos, pero el nitrofenol liberado de los sustratos desarrolla un color amarillo. Así, se han desarrollado sustratos sintéticos para medir rápidamente la actividad de diversas enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, Sigma-Aldrich vende aproximadamente 500 compuestos de nitrofenol. Sin embargo, estos compuestos muestran baja absorbancia y se difunden fácilmente a través de la pared celular, de modo que diversos productos de reacción celulares se mezclan entre sí. Así, estos compuestos de nitrofenol no son adecuados para detectar la actividad de cada tipo de célula o colonia.

Además, los compuestos fenólicos no se degradan fácilmente en células de *E. coli* y, así, cantidades incluso muy pequeñas de productos de reacción producidos por reacciones enzimáticas se pueden detectar con alta sensibilidad. Esta propiedad está de acuerdo con el hecho de que, cuando se usa IPTG (isopropiltiogalactósido) que es no degradable para inducir la expresión de un promotor de lactosa, incluso una pequeña cantidad de IPTG muestra un fuerte efecto de inducción de la expresión. Recientemente, se presentó un estudio sobre la regulación de la estabilidad intracelular de una proteína indicadora para regular la sensibilidad y la cuantificación de un promotor (Neuenschwander y cols., (2007) Nat. Biotech. 25(10): 1145-1147). Aunque algunos derivados fenólicos muestran citotoxicidad, aproximadamente 100 ppm o menos de compuestos fenólicos no tenían ninguna influencia sobre el crecimiento de *E. coli*.

Como tales, debido a que los compuestos fenólicos no se degradan fácilmente en las células, pueden detectar con alta sensibilidad cantidades incluso vestigiales de productos de reacción producidos por reacciones enzimáticas y se pueden usar como sustratos diversos compuestos de descarga de fenol capaces de liberar fenol en reacciones enzimáticas. Basándose en este hecho, los presentes inventores han desarrollado métodos para cribar y cuantificar la actividad enzimática, comprendiendo el método diseñar un circuito genético artificial que identifica compuestos fenólicos, introducir el circuito genético en microorganismos para obtener microorganismos recombinantes, añadir un sustrato que contiene grupo fenol ajustado para el propósito a los microorganismos recombinantes y medir la actividad cuantitativa de los indicadores, tales como indicadores de fluorescencia o resistencia a antibiótico, cuya expresión se induce al identificar fenoles producidos según la función de los genes enzimáticos.

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para rastrear la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

En el método de la presente invención, la etapa de preparación de los microorganismos recombinantes, que tienen introducidos en los mismos la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico, se puede llevar a cabo mediante microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico e introducir la clonoteca o genoteca en los microorganismos.

En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para cribar una actividad enzimática buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada el compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico

mediante una reacción enzimática; y (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

5 En la etapa (a) del método de la presente invención, el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico puede estar contenido en el citoplasma de los microorganismos usando un plásmido o puede estar insertado en el ADN cromosómico.

10 En otro aspecto más, la presente divulgación se dirige a un método para cuantificar una actividad enzimática buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

25 En otro aspecto adicional, la presente divulgación se dirige a un método para cuantificar la actividad de una enzima buscada usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica una enzima que se va a cribar; (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes; (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; y (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática.

40 Además, la presente divulgación se dirige a un método para cribar una actividad enzimática a partir de una biblioteca metagenómica. Específicamente, la presente divulgación se dirige a un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática.

45 Según se usa en la presente, el término "metagenoma" se identifica como "los genomas colectivos de todos los microorganismos presentes en un hábitat dado" (Handelsman y cols., (1998) *Chem. Biol.* 5: R245-R249). Sin embargo, este término también está destinado a incluir clones, incluyendo los genomas o genes extraídos de muestras ambientales, y una serie de estudios asociados con tal metagenoma también se denominan "metagenómica". En estudios relacionados, Venter y cols. (Venter y cols., (2004) *Science* 304: 66-74) realizaron nuevos estudios conceptuales sobre la secuenciación de ecosistemas bajo el apoyo del US DOE y determinaron aproximadamente mil millones de secuencias nucleotídicas al aplicar la secuenciación aleatoria completa a una biblioteca metagenómica construida a partir de muestras de agua marina recogidas del Triángulo de las Bermudas. La secuenciación nucleotídica revelaba que las muestras de agua marina recogidas contenían al menos 1.800 especies genómicas microbianas, incluyendo 148 filotipos bacterianos desconocidos, y que se encontraron 1,2 millones o más de nuevos genes. Los estudios metagenómicos son adecuados para usar microorganismos que son difíciles o imposibles de cultivar y se pueden considerar como enfoques biológicos moleculares que se realizan usando todos los ADN extraídos de cualquier ambiente, si el aislamiento de ADN mediante cultivo es imposible.

60 Tales bibliotecas metagenómicas ambientales son conjuntos de genes procedentes de diversos ambientes tales como suelo o agua marina y se pueden construir mediante diversos métodos conocidos.

65 En la presente divulgación, se construye una biblioteca metagenómica al recoger una comunidad microbiana de la naturaleza o cualquier zona (fuente termal, granja, compost, suelo contaminado con aceite, etc.), extraer un genoma directamente de la comunidad microbiana e introducir el genoma extraído en un vector. Ejemplos de un vector que se puede usar en la presente invención incluyen plásmidos, fósidos, cósmidos, BAC (cromosoma artificial bacteriano), YAC (cromosoma artificial de levadura), etc. Los plásmidos tienen una ventaja ya que el grado de

expresión y la construcción de un vector se puede alcanzar según la intención del usuario, de modo que se puede optimizar la expresión génica. Sin embargo, existe una desventaja ya que, debido a que se introduce un gen que tiene un tamaño pequeño (□ 10 kb), la recuperación de un gen de operón es imposible. Un gen que tiene un tamaño de 37-52 kb se puede introducir en un fósido, un cósmido o similares. Particularmente, se usan frecuentemente vectores fosmídicos debido a que tienen una alta eficacia de transformación. Los BAC se pueden introducir con un gen que tiene un tamaño grande (150-350 kb) y así se usan en el proyecto del genoma humano y el análisis genómico de ratas y ratones.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se dirige a un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de una enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar a biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural; (b) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (c) introducir la biblioteca metagenómica y el circuito genético artificial en microorganismos hospedadores para construir una biblioteca de microorganismos transformados; (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

En el método de la presente divulgación, la etapa de construcción de la biblioteca de microorganismos transformados que tienen introducidos en los mismos la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico se puede llevar a cabo mediante microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico e introduciendo la biblioteca metagenómica en los microorganismos.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación se dirige a un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de una enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar a biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural; (b) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador; (c) introducir la biblioteca metagenómica en los microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma el circuito genético artificial para construir una biblioteca de microorganismos transformados; (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática; (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

En la etapa (a) del método de la presente invención, el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico puede estar contenido en el citoplasma de los microorganismos usando un plásmido o insertado en el ADN cromosómico.

Según el método de la presente divulgación, una enzima que tiene una actividad deseada se puede cribar y recuperar al construir un circuito genético que identifica fenoles, construir una biblioteca metagenómica ambiental, transformar por etapas o simultáneamente la biblioteca en un microorganismo adecuado, tratar el microorganismo con un compuesto de descarga de fenol como un sustrato y medir la actividad cuantitativa de un indicador tal como un indicador de fluorescencia o resistencia a antibiótico, cuya expresión era inducida al identificar un fenol producido según la función y la actividad del gen enzimático introducido en la célula.

En la presente divulgación, el gen indicador y el promotor que regula la expresión del gen indicador pueden estar conectados operativamente entre sí.

En la presente invención, la región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión del gen indicador aguas abajo puede ser una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para activar el promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo.

En la presente divulgación, el gen que codifica la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce el compuesto fenólico y el promotor que regula la expresión de la proteína reguladora pueden estar conectados operativamente entre sí.

La FIG. 1(A) muestra un principio de detección de diversos tipos de actividades enzimáticas que usa un circuito genético artificial (sistema genético de cribado de enzimas (GESS)) según la presente invención y la FIG. 1B muestra esquemáticamente un vector de GESS (pGESS) que emplea el circuito genético artificial según la presente invención y es una vista ampliada de la región reguladora de la expresión génica del vector. En la FIG. 1, TRF es un factor de regulación de la transcripción que significa una región (p. ej., *dmpR*: gen que codifica el regulador positivo de la ruta catabólica del fenol) que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico en la presente invención y la región reguladora de la expresión génica se puede dividir en gran parte en tres regiones: *P_x*: un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico; *OpR* (operador para el indicador): una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico TRF para inducir un gen indicador aguas abajo; y *P_R*: un promotor que regula la expresión del gen indicador. Adicionalmente, el circuito genético artificial puede comprender RBS (sitio de unión ribosómica), un terminador directo de la transcripción (t▶), un terminador inverso de la transcripción (t◀), etc.

Según se muestra en las FIGS. 1A y 1B, el término "circuito genético artificial (circuito genético rediseñado)" significa una construcción genética que comprende (i) un gen que codifica una proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que reconoce un compuesto fenólico, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador.

Según se usa en la presente, la expresión "enzima que se va a cribar" puede ser una enzima que puede liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática. Ejemplos de las enzimas incluyen α -glucosidasa, β -glucosidasa, celulasa, glucosilceramidasa, fosfatasa, fitasa, esterasa, lipasa, uretanasa, amidasa, peptidasa, proteinasa, oxidorreductasa, fenol-liasa, dihalogenasa, isomerasa, monooxigenasa y dioxygenasa.

Según se usa en la presente, la "proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico" es una proteína que regula la expresión de una enzima que degrada un compuesto fenólico e indica el fenol para hacer funcionar el promotor que regula la expresión de la enzima que degrada un compuesto fenólico e inducir la expresión del indicador conectado al promotor.

Con respecto a la "proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico", genes que tienen la actividad de degradar compuestos orgánicos aromáticos, incluyendo fenol, xileno, tolueno y benceno, se encuentran principalmente en *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter* sp. Estos genes consisten en operones multifuncionales y se expresan mediante activadores de la transcripción dependientes de σ^{54} . Ejemplos típicos de los activadores de la transcripción incluyen XylR, DmpR, MopR, PhhR, PhIR, TbuT y similares y, entre ellos, los mejor conocidos son XylR implicado en el catabolismo del tolueno y el xileno en *Pseudomonas putida* (Ramos & Marques, (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 341-372.) y DmpR implicado en el catabolismo del fenol (Shingler y cols., (1993) *J. Bacteriol.* 175: 1596-1604). Particularmente, a fin de detectar tolueno, xileno o fenol contaminado procedente de ambientes naturales, se ha estudiado frecuentemente XylR o DmpR como el concepto de biosensores microbianos (Ramírez y cols., (2004), documento US 6.803.224 B2; Wise y cols., (2004), documento US 6.773.918 B2). El regulador de la familia NtrC consiste en una combinación de un dominio (dominio A) que reconoce un activador tal como fenol o xileno, un dominio (dominio C) que tiene actividad de ATPasa y un dominio (dominio D) que funciona para unirse a ADN. Así, cuando no hay una molécula de fenol, el dominio A inhibe la transcripción, pero cuando una molécula de fenol se une para inhibir el dominio A, los dominios C y D muestran una función de activación de la transcripción. En los últimos años, se presentaron un estudio sobre el uso del dominio A para detectar nuevas sustancias y un estudio sobre la modificación de la especificidad por el dominio A (Pavel y cols., (1994) *J. Bacteriol.* 176(4): 7550-7557).

Así, la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que se usa preferentemente puede ser *dmpR* que es una proteína reguladora de operón degradante de fenol procedente de *P. putida*, o una variante de la misma. *DmpR* es la región reguladora de la actividad de transcripción dependiente de σ^{54} del operón *dmp* que tiene la actividad de degradar compuestos orgánicos aromáticos, incluyendo fenol, xileno, tolueno y benceno. El operón *dmp* procedente de *P. putida* consiste en 15 genes y, entre estos genes, *dmpKLMNOP* codifica enzimas necesarias para la hidroxilación del fenol y *dmpQBCDEFGHI* codifica enzimas de la ruta catabólica meta que degrada productos intermedios de catecol. La expresión del operón *dmpKLMNOP* se activa cuando el regulador de la transcripción dependiente de σ^{54} *dmpR* se une al operador *dmp* aguas arriba de *dmpK* y el regulador de la transcripción *dmpR* se

conoce como regulador de la transcripción dependiente de σ^{70} (Lee y cols., (1996) *J. Biol. Chem.* 271(29): 17281-17286). Además, ejemplos de la variante de dmpR incluyen E135K (que significa una variación de E a K en la posición 135 de la secuencia de aminoácidos de dmpR), E172K, D135N, D135N/E172K, F65L, L184I, F42Y, R109C, L113V, D116N, F122L, K6E/F42S, Q10R/K117M, Q10R, D116G/K117R, D116V, etc. Debido a que estas variantes tienen alta afinidad para fenoles, diversas variantes que contienen variaciones simples o múltiples en estas posiciones o posiciones cercanas a las mismas, así como diversas variantes de dmpR, estarán dentro del alcance de la presente invención.

En la presente invención, según se muestra en la FIG. 1B, la "región reguladora de la expresión génica" es una porción que regula el circuito genético artificial y consiste en (i) un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que es un regulador de la transcripción, (ii) una región a la que se une la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y (iii) un promotor que regula la expresión del gen indicador. Cuando no hay molécula de fenol, el dominio A de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico inhibe la transcripción, pero cuando una molécula de fenol se une para inhibir el dominio A, los dominios C y D muestran una función de activación de la transcripción y así se unen a la región OpR (operador para el indicador) según se muestra en la FIG. 1B y la actividad de la misma se regula dependiendo de σ^{54} .

Según se usa en la presente, el término "promotor" significa bien un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, o bien un promotor que regula la expresión de la proteína indicadora. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor de operón dmpR o dmp de *Pseudomonas* o un promotor para la expresión de proteína general. Para la expresión de alto nivel de una proteína extraña, se puede usar un promotor de alta expresión tal como un promotor trc, T7, lac o ara, y particularmente, se puede usar en vector de alta expresión constitutivo P_{hce} que no requiere un inductor.

En la presente invención, el promotor que regula la expresión de la proteína indicadora puede ser un promotor dependiente de σ^{54} de *E. coli*. Además, un experto en la técnica apreciará que el promotor puede ser un derivado de *Pseudomonas putida*, una levadura o similares dependiendo del hospedador de pGESS.

En la presente invención, el circuito genético artificial comprende, además del promotor anterior, un sitio de unión ribosómica (RBS) que facilita la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción. A saber, el circuito genético artificial puede comprender, además del promotor, un RBS y/o un terminador de la transcripción, que regula la expresión de la proteína reguladora.

Generalmente, la expresión de una proteína empieza con el codón de inicio AUG (metionina) o GUG (valina) en ARNm y la discriminación entre los codones de inicio de la proteína AUG y GUG y el residuo AUG o GUG presente en la proteína ribosómica está determinada por un RBS (o secuencia de Shine-Dalgarno (SD)) rico en bases de purina de ADN, en el que se sabe que el RBS es diferente entre especies (Stryer, L., (1995) *Biochemistry*, (4ª ed.) W. H. Freeman, Capítulo 34, Protein Synthesis). El circuito genético artificial construido en la presente invención comprende un regulador de la transcripción procedente de *Pseudomonas*, que es significativamente diferente de *E. coli*, el hospedador del circuito genético. Por otra parte, para la expresión génica dependiente de σ^{54} , un sitio de unión a σ^{54} o un regulador dependiente de σ^{54} es significativamente diferente del derivado de *E. coli*. Así, a fin de facilitar la expresión del gen indicador en el RBS de *Pseudomonas* o el hospedador *E. coli*, se puede usar en la presente invención RBS de *E. coli* o RBS que se puede derivar de todas las cepas microbianas. En una realización de la presente invención, se puede usar RBS de T7 procedente del bacteriófago T7.

En la presente invención, el terminador de la transcripción puede ser preferiblemente rrnBT1T2 o tL3. Además, cualquier terminador de la transcripción que se use convencionalmente en la técnica se puede usar en la presente invención.

En la presente invención, el gen indicador puede ser uno o más seleccionados entre proteínas de fluorescencia y genes de resistencia a antibióticos. Como la proteína de fluorescencia, se usa preferiblemente GFP, GFPuv o RFP. Además, se puede usar cualquier proteína de fluorescencia con tal de que pueda alcanzar el objetivo de la presente invención. Además, ejemplos de un gen de resistencia a antibiótico que se puede usar en la presente invención incluyen genes de resistencia a antibióticos convencionales, incluyendo kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina.

En una realización de la presente invención, el gen indicador puede ser un indicador doble que consiste tanto en una proteína de fluorescencia como en un gen de resistencia a antibiótico, o un indicador múltiple que consiste en dos o más genes. Según la presente divulgación, la biblioteca metagenómica y el circuito genético artificial que identifica fenol se transforman por etapas en un hospedador microbiano adecuado. La transformación se puede llevar a cabo usando cualquier método conocidos. A fin de incrementar la eficacia de la transformación, se puede usar preferiblemente electroporación.

En la presente invención, un gen que codifica la enzima que se va a cribar se puede proporcionar en la forma de una clonoteca o biblioteca genética. Por ejemplo, se puede proporcionar en la forma de un gen individual, una biblioteca genómica, un metagenoma o una biblioteca metagenómica, que se pueda aplicar en el campo de la biología

molecular. Además, el gen individual se puede proporcionar en una forma en la que está contenido en un vector o un microorganismo.

5 En la presente invención, el circuito genético artificial se puede proporcionar en la forma de un vector o un microorganismo. En la presente invención, el microorganismo puede ser preferiblemente *E. coli*, una levadura, una célula vegetal o una célula animal. Además, se puede usar un extracto libre de células obtenido a partir de tales células.

10 Según la presente invención, el microorganismo transformado con el circuito genético se trata con uno o más sustratos seleccionados de entre compuestos de descarga de fenol capaces de liberar fenoles mediante una reacción enzimática. Preferiblemente, a fin de optimizar la reacción enzimática, el tiempo de adición del sustrato se puede controlar de modo que la etapa de crecimiento celular y la etapa de activación del circuito genético estén separadas entre sí. Por ejemplo, la etapa de tratamiento con el sustrato puede consistir en las etapas de: recoger un microorganismo sano desarrollado en medio nutritivo; y tratar el microorganismo recogido con el sustrato en medio mínimo.

15 El medio nutritivo o medio mínimo puede ser cualquier medio que se pueda usar generalmente en la especialidad.

20 Preferiblemente, El microorganismo transformado que reconoce fenoles se trata con el sustrato cuando las células alcanzan una OD₆₀₀ de aproximadamente 1,5-4, con lo que se puede optimizar la reacción de activación de la enzima. Más preferiblemente, la reacción de activación se realiza durante 14-16 horas, con lo que la reacción enzimática se puede optimizar.

25 La proteína reguladora de la transcripción depende de σ^{54} y funciona bien en un ambiente en el que los componentes nutritivos estén limitados (Sze y cols., (1996) *J. Bacteriol.* 178: 3727-3735). Para un cultivo líquido, en medio LB, la velocidad de crecimiento es alta, pero la reactividad del circuito genético es baja. Por el contrario, en medio M9, la reactividad es alta pero la velocidad de crecimiento es lenta. Por estas razones, los medios LB y M9 no son adecuados para el cribado de alto rendimiento. Además, cuando el sustrato se añade a la fase de cultivo inicial, se producirá una reacción enzimática a medida que las células crecen, con lo que se producirá un error en la comparación de la actividad enzimática debido a la diferencia en el crecimiento entre las células. A fin de vencer estos inconvenientes, en una realización de la presente invención, el tiempo de adición del sustrato se controla de modo que la etapa de crecimiento celular y la etapa de activación del circuito genético artificial se separen una de otra como sigue, optimizando de ese modo la reacción enzimática: 1) etapa de crecimiento celular de cultivo con agitación de las células usando medio LB rico en nutrientes a 37°C y a continuación recogiendo las células a una concentración celular (OD₆₀₀) de aproximadamente 1,5-4; y 2) etapa de activación del circuito genético artificial sometiendo a las células recogidas a una reacción enzimática usando medio M9 que contiene sustrato a 30°C durante 14-16 horas.

30 En la presente invención, el "compuesto de descarga de fenol" sirve como un sustrato que se puede usar para detectar actividad enzimática intracelular. Es un compuesto capaz de descargar fenol mediante una reacción enzimática. Específicamente, es un compuesto capaz de descargar los siguientes compuestos fenólicos mediante una reacción enzimática: fenol, 2-clorofenol, 2-yodofenol, 2-fluorofenol, o-cresol, 2-etilfenol, m-cresol, 2-nitrofenol, catecol, 2-metoxifenol, 2-aminofenol, 2,3-diclorofenol, 3-clorofenol, 2,3-dimetilfenol, 3-nitrofenol, 4-clorofenol, p-cresol, 2,5-diclorofenol, 2,5-dimetilfenol, etc. Este compuesto también se denomina "sustrato marcador fenólico".

35 Ejemplos del compuesto de descarga de fenol capaces de liberar fenol mediante una reacción enzimática, esto es, el sustrato marcador fenólico, incluyen compuestos fenólicos que contienen éster (-OOC-), éter (-OC-), glucósido (-O-Glc) o fosfoéster (-O-PO₃), que sustituye al grupo hidroxilo (-OH) del fenol, así como derivados fenólicos que contienen un grupo alquilo (-CH₃), hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), tiol (-SH), amida (-NH-CO- o -CO-NH-), sulfuro (-S-SH) o halógeno (-Cl, -Br, -F) en la posición *orto*, *meta* o *para* y/o compuestos de anillo bencénico.

40 Específicamente, ejemplos del sustrato marcador fenólico que se usa en la presente divulgación pueden incluir diversos derivados fenólicos que tienen un grupo acoplado covalentemente a los mismos. Por ejemplo, cuando se usa como el sustrato un compuesto fenólico que contiene éster (-OOC-), éter (-OC-), glucósido (-O-Glc) o fosfoéster (-O-PO₃), que sustituye al grupo hidroxilo del sustrato, se puede usar para detectar actividad de esterasa, lipasa, glucosidasa, fosfatasa o fitasa. Además, el sustrato marcador fenólico puede ser una sustancia preparada al introducir un nuevo metilo (-CH₃), hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amino (-NH₂) o tiol (-SH) en la posición *orto*, *meta* o *para*. Cuando se usa como el sustrato un compuesto fenólico que tiene amida (-NH-CO- o -CO-NH-) o sulfuro (-S-SH) en la posición *orto*, *meta* o *para*, el compuesto fenólico que tiene el grupo amida se puede usar para detectar actividad de amidasa o peptidasa y el compuesto fenólico que tiene el grupo sulfuro se puede usar para detectar la actividad de oxidoreductasa.







45 Además, cuando se usa como el sustrato marcador fenólico un compuesto fenólico que tiene un nuevo enlace con carbono acoplado al mismo, esto es, Ph-C(R), se puede usar para detectar la actividad de fenol-iasa que rompe el enlace con carbono para liberar fenol. El sustrato marcador fenólico también puede ser un compuesto de anillo

bencénico que puede detectar la actividad de oxigenasa tal como monooxigenasa o dioxigenasa, que está implicada en la oxidación de compuestos aromáticos. Un compuesto fenólico que contiene un halógeno, tal como cloro (Cl), bromo (Br) o flúor (F), acoplado al mismo también se puede usar como el sustrato. en este caso, la actividad de enzimas que actúan sobre el compuesto fenólico halogenado para deshalogenar o isomerizar el compuesto se pueden detectar según la presente invención.

Además, la actividad de transferasa que transfiere un enlace covalente desde el susodicho compuesto fenólico a otras moléculas orgánicas o la actividad de ligasa que produce un nuevo enlace covalente también se puede detectar según el mismo principio que se describe anteriormente en la presente invención.

Así, el uso de diversos sustratos marcadores fenólicos que se describen en la presente invención permite la detección de hidrolasa, oxidorreductasa, isomerasa, liasa, transferasa y similares, intracelulares. Los sustratos que se usan para detectar actividad enzimática intracelular en la presente invención se refiere a compuestos marcadores fenólicos, incluyendo diversos sustratos sintéticos tales como fenol, o/p-nitrofenol, o/p-clorofenol, etc. Cuando una enzima adecuada actúe sobre tales compuestos marcadores fenólicos, se liberará fenol de los compuestos marcadores fenólicos. Por ejemplo, cuando la β-galactosidasa de *E. coli* (lacZ) actúa sobre fenil-β-glucósido, el compuesto fenólico será liberado por la actividad de la enzima. La Tabla 1 posterior muestra ejemplos de las características de los sustratos marcadores fenólicos y las reacciones enzimáticas relacionadas.

[Tabla 1]

Sustratos fenólicos	Grupos X	Enzimas buscadas
	α,β-glucósidos, fosfato, fosforotioato	α,β-glucosidasa, celulasa, glucosilceramidasa, fosfatasa, fitasa
	alquilo, amina	esterasa, lipasa, uretanasa
	alquilo, aminoácidos	amidasa, peptidasa, proteinasa
	alquilo, aminoácidos	oxidorreductasas
	aminoácidos, piruvato, halógeno (Cl, Br, F)	fenol-liasa, deshalogenasa, isomerasa
	alquilo, B(OH) ₂	mono-, di-oxigenasas

Específicamente, cuando un gen enzimático se introduce en un microorganismo recombinante que contiene el circuito genético artificial que reconoce fenol y a continuación el microorganismo se trata con el sustrato marcador fenólico, la concentración del compuesto fenólico cambiará dependiendo de la función y la actividad del gen enzimático en las células. Así, cuando se mide un incremento en la cantidad de un gen indicador (tal como un indicador de fluorescencia o resistencia a antibiótico) mediante la función inductora de la expresión del compuesto fenólico usando diversas técnicas tales como análisis de fluorescencia o análisis de resistencia a antibiótico, se pueden detectar actividades enzimáticas intracelulares y extracelulares con gran sensibilidad. Además, la proteína de fluorescencia o la proteína de resistencia a antibiótico que se usa como en indicador en la presente invención se puede medir usando un método de medida de alta sensibilidad y se define en una célula sin pasar a través de la membrana celular y así la propiedad de un gen extraño que se expresa en la célula es exhibida individualmente. Así, debido a que una sola célula actúa como un reactor o analizador independiente, la actividad del indicado cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática se puede medir usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), análisis de imágenes por fluorescencia de microcolonias, análisis espectral de fluorescencia o un medio selectivo a un antibiótico, que pueden analizar de varios millones a varias decenas de millones de muestras.

Según se usa en la presente, el término "muestra ambiental" se refiere a una muestra procedente de un ambiente tal como suelo o agua marina.

En la presente divulgación, la biblioteca metagenómica se puede construir al introducir ADN derivado del suelo en un vector seleccionado del grupo que consiste en plásmidos, fósidos, cósmidos, BAC y YAC.

5 En la presente invención, cuando se usa una proteína de fluorescencia como en indicador, los microorganismos se tratan con el sustrato para realizar una reacción enzimática y a continuación se realiza un cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen fluorescencia usando el clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). El FACS es muy adecuado para el objetivo de la presente invención, debido a que permite el análisis y la recuperación de cepas de la biblioteca con alto rendimiento ($\square 10^6$ células/min.). Las cepas recuperadas se siembran sobre una placa de sustrato en estado sólido ($\square 10^3$ células/placa Petri de 90 mm) y las cepas que tienen actividad enzimática se seleccionan finalmente usando un microscopio de fluorescencia (véase la FIG. 2A).

10 Cuando se usa como el indicador una proteína de resistencia a antibiótico, las cepas se cultivan en medio líquido que contiene antibiótico de modo que solo puedan crecer las cepas que tengan actividad enzimática. Finalmente, solo las cepas que tengan actividad enzimática se enriquecen en el medio de cultivo. Las cepas cultivadas se siembran sobre una placa de sustrato sólido que contiene antibiótico ($\square 10^3$ células/placa Petri de 90 mm) y las cepas que tienen actividad enzimática se seleccionan finalmente mediante la observación de colonias vivas (véase la FIG. 2B).

15 Cuando se usa como el sustrato un indicador doble, puede ser una combinación del indicador de fluorescencia y la proteína de resistencia a antibiótico. Tiene una ventaja en que se pueden eliminar clones positivos falsos que se pueden presentar en el cribado de alto rendimiento.

20 En la presente divulgación, a fin de recuperar un gen fosmídico puro que incluye un gen buscado excluyendo el circuito genético artificial (pGESS-GFP) de células microbianas seleccionadas, se pueden usar los tres métodos siguientes.

25 El primer método es un método de tratamiento del vector con enzimas de restricción para retirar el ADN que contiene el circuito genético artificial y recuperar el gen fosmídico. Específicamente, el vector se digiere con enzimas de restricción tales como *Not* I y *Eco*R I en 2-3 fragmentos y a continuación el gen del vector fosmídico se recupera mediante electroforesis en gel (véase la FIG. 3A).

30 El segundo método es un método para construir y usar una cepa microbiana que tiene el circuito genético artificial introducido en su sistema cromosómico. Según este método, solo el gen fosmídico que contiene gen metagenómico se puede recuperar sin retirar el gen genético artificial, se puede evitar un problema de homología basada en plásmido. Así, este método hace posible construir una tecnología de cribado de alto rendimiento más estable (véase la FIG. 3B).

35 El tercer método es un método para introducir un gen suicida en el circuito genético artificial. Según este método, el circuito genético artificial que tiene el gen suicida introducido en el mismo se puede perder mediante un procedimiento de curado adicional durante la recuperación del gen fosmídico, con lo que solo el gen fosmídico se puede recuperar (véase la FIG. 3C).

40 Según la presente divulgación, la identificación de genes útiles se puede realizar mediante cualquier método de secuenciación conocido en la especialidad. Después de que se hayan analizado las secuencias de ADN y aminoácidos, la información del gen recuperado se puede obtener mediante el análisis de la homología de bases en un banco de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

45 En una realización específica de la presente invención, el cribado de una enzima buscada desde una biblioteca metagenómica usando el circuito genético artificial se puede realizar según el procedimiento mostrado en la FIG. 4.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Será obvio para un experto normal en la técnica que estos ejemplos tienen propósitos ilustrativos y no se debe considerar que limiten el alcance de la presente invención.

55 Ejemplo 1: Construcción de un circuito genético artificial basada en el regulador de la expresión *dmpR* que detecta fenol

Un circuito genético artificial comprende una región de proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico, una región reguladora de la expresión génica que comprende promotores y al menos una región indicadora seleccionada de proteínas de fluorescencia y genes de resistencia a antibióticos.

Se construyó un circuito genético artificial (pGESS-FP) basado en el plásmido pUC19 usando el operón *dmp* catabólico de fenol derivado de *Pseudomonas putida* como la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que detecta fenol, RBS de *P. putida* como la región que regula la expresión de la proteína reguladora y proteína de fluorescencia (FP) como la proteína indicadora.

En la presente invención, a fin de construir un circuito genético artificial identificador de fenol que comprende gen de EGFP (proteína de fluorescencia verde potenciada) como el indicador, un plásmido pMGFP (Ha y cols., (2007)- *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22): 7408-7414) se digirió con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Hind* III para obtener un fragmento de EGFP de 720 pb que a continuación se introdujo en un vector pUC19, construyendo de ese modo pUGFP.

En la presente invención, la amplificación por PCR se realizó en *Pseudomonas putida* KCTC 1452 usando los cebadores directo e inverso (SEQ ID N°: 1 y SEQ ID N°: 2), preparando de ese modo un fragmento de ADN de 2.157 pb (SEQ ID N°: 21) que comprende un gen *dmpR* (1.692 pb) que contiene el conector de enzima de restricción *EcoR* I, una región operadora-promotora de *dmp*, una porción (42 pb) del gen *dmpK* y una secuencia de enzima de restricción (12 pb) insertada durante la clonación. El gen *dmpK* estaba situado (1.693-2.097 pb) 405 pb separado de *dmpR* y el gen indicador estaba situado 42 pb detrás del extremo N de *dmpK*.

SEQ ID N°: 1: 5'-CCGGAATTCGAGCTGATCGAAAGTCGG-3'

SEQ ID N°: 2: 5'-CCGGAATTCCTAGCCTTCGATGCCGAT-3'

Se dejó que permaneciera el fragmento N-terminal de *dmpK* a fin de mantener establemente la función potenciadora de la transcripción de la región operadora-promotora de *dmp* incluso si se usaban como el indicador diversas proteínas de fluorescencia o proteínas de resistencia a antibióticos. El producto de PCR se clonó en el sitio *EcoR* I de pUGFP, construyendo de ese modo pGESS-EGFP (I) (5.510 pb) (véase la FIG. 5).

A fin de mejorar la expresión de la proteína indicadora en el hospedador *E. coli*, se construyeron pGESS-EGFP(II) que comprende RBS de *E. coli* (RBS de T7) (Simons y cols., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 1624-1628) y un terminador de la transcripción, además de pGESS-EGFP(I) que tiene RBS de *Pseudomonas*. RBS de T7 de *E. coli* se introdujo antes del indicador del siguiente modo. El gen GFP se amplificó mediante PCR usando cebadores de SEQ ID N°: 3 y 4 que tienen RBS de T7 de 14 pb como una secuencia homóloga y el producto de PCR junto con ADN de pGESS-EGFP(I) que se ha digerido con enzima de restricción *BsrG* I se introdujo en DH5 α de *E. coli* que contiene un vector pKD-Cm, con lo que RBS de T7 en lugar del gen *dmpK* se introdujo mediante un método de recombinación homóloga.

SEQ ID N° 3:

5'-GCACAGCTGTTGCACTTTGTCCTGCGCAATCCGCCAACCTGGAGAAGGAGATATACATATG
GTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'

SEQ ID N° 4:

5'-GATTTAATCTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGAAGCTTACTTGTA
CAGCTTGTC-3'

La recombinación homóloga se realizó al preparar células hospedadores e insertar un gen linealizado (Zhang y cols., (2000) *Nat. Biotech.* 18: 1314-1317; Zhang y cols., (1998) *Nat. Genet.* 20: 123-128; Seung-Koo Lee y cols. (2005) Solicitud de Patente Coreana N° 10-2005-0116672). Una sola colonia de *E. coli* DH5 α que contiene un vector pKD46-Cm que codifica recombinasa λ -roja se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contiene 25 μ g/ml de cloranfenicol y se cultiva con agitación a 30°C durante 16 horas. El caldo de cultivo se inoculó en 100 ml de medio líquido LB (que contiene 25 μ g/ml de cloranfenicol y 50 mM de arabinosa) a una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 30°C hasta que la concentración celular (OD₆₀₀/ml) alcanzaba 0,5-0,6. Después de la finalización del cultivo, se prepararon células competentes para la electroporación (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Joseph Sambrook, David W. Russell), después de lo cual 10 ng de pGESS-EGFP(I), digeridos con enzima de restricción *BsrG* I y 100 ng de un producto de PCR de GFP introducida con RBS de T7, se añadieron a la célula competente y se sometieron a electroporación (18 kV/cm, 25 μ F). A continuación, se añadió a esto 1 ml de medio de SOC y la recombinación homóloga de las células se indujo a 25°C durante 20 horas. Las células se sembraron sobre medio sólido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina y a continuación se cultivaron durante la noche a 37°C para seleccionar pGESS-EGFP(II). Para referencia, el vector pKD46-Cm contiene un origen de replicación sensible a

la temperatura y así se retira a 37°C, de modo que se obtienen células que tienen el gen pGESS-EGFP(II) solo introducido en las mismas.

5 425 pb de un terminador de la transcripción rrnBT1T2 procedente de pHCEIB (BioLeaders, Corea) se amplificó mediante PCR usando cebadores de SEQ ID N°: 5 y 6 y el producto de PCR de 2.831 pb que comprende dmpR, operador-promotor dmp, RBS de T7 RBS y región de proteína indicadora GFP procedente de pGESS-EGFP(I) se amplificó usando cebadores de SEQ ID N°: 7 y 8, preparando de ese modo dos fragmentos de ADN. Se realizó PCR solapada usando los dos fragmentos de ADN como una plantilla con los cebadores de SEQ ID N°: 5 y 8, con los que los dos fragmentos se ligaban entre sí.

10 El fragmento resultante se reemplazó en el pGESS-EGFP(I) original mediante un método de recombinación homóloga. A continuación, el vector se digiere con *EcoR* I, después de lo cual un terminador de la transcripción tL3 obtenido a partir del vector pKD46 mediante amplificación por PCR usando los cebadores de SEQ ID N°: 9 y 10 se ligó al extremo C de dmpR y se introdujo en *E. coli* mediante electroporación, construyendo de ese modo pGESS-EGFP(II) 6.171 pb (véase el FIG. 6).

SEQ ID N° 5:

5'- ATGGACAAGCTGTACAAGTAAGCTTCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGA-3 '

SEQ ID N° 6:

20 5'- AGCGGATAACAATTTACACACAGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGAGTTTGTAGAA
ACGCAAAAAGG -3 '

SEQ ID N° 7:

5'-TCTCTCATCCGCCAAAACAGGAATTCCTAGCCTTCGATGCCGATTT-3 '

SEQ ID N° 8:

25 5'- TCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGAAGCTTACTTGTACAGCTTGTCCAT-3 '

SEQ ID N°: 9: 5'-CCCGAATTCTTCTTCGTCTGTTTCTACTG-3'

SEQ ID N°: 10: 5'-CCCGAATTCAATGGCGATGACGCATCCTCA-3'

30 Además, en la presente invención, a fin hacer ventajosa la GFP_{uv} para la observación visual como el indicador en el sistema la presente invención, EGFP de pGESS-EGFP(I) se reemplazó por GFP_{uv} para preparar pGESS-GFP_{uv}(I). Específicamente, el gen GFP_{uv} de 717 pb procedente de pGFP_{uv} (Clontech, EE. UU. de A.) se amplificó mediante PCR usando los cebadores directo e inverso de SEQ ID N°: 11 y 12 y se introdujo en pGESS-EGFP(I) mediante recombinación homóloga.

SEQ ID N° 11:

5'-CGGATAACAATTTACACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTATTTGTAGA

35 GCTCATCCA-3 '

SEQ ID N° 12:

5'. ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCACACCGACTTTCGATCAGCTCATGAGTAAAGG

AGAAGAACT-3 '

40 En muchos casos, se usa preferiblemente un gen de resistencia a antibiótico, tal como cloranfenicol, tetraciclina o kanamicina, además de la proteína de fluorescencia, como el gen indicador del circuito genético artificial. A saber, cuando se usa un gen de resistencia a antibiótico como el indicador, no se requiere un sistema de análisis de imágenes y se pueden analizar rápidamente más de 10⁶-10⁷ colonias sobre un medio sólido.

A fin de construir un circuito genético identificador de fenol que comprende un gen de resistencia a antibiótico como un indicador, genes de resistencia a cloranfenicol, tetraciclina kanamicina se amplificaron mediante PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID N°: 13 y 14, un conjunto de cebadores de SEQ ID N°: 15 y 16 y un conjunto de cebadores de SEQ ID N°: 17 y 18, respectivamente, preparando de ese modo fragmentos de ADN de 660 pb, 813 pb y 1,191 pb, respectivamente. A continuación, la región indicadora de pGESS-EGFP(II) se reemplazó con cada uno de los genes de resistencia a antibiótico mediante recombinación homóloga (véase la FIG. 7).

SEQ ID N° 13:

5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCTCATGGAGAAAAA
AATCACTGG-3'

10 SEQ ID N° 14:

5'-CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTACGCCCCGC
CCTGCCACT-3'

SEQ ID N° 15:

15 5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCTCATGAAATCTAA
CAATGCGCT-3'

SEQ ID N° 16:

5'-CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCAGGTGAGG
TGGCCCGGC-3'

SEQ ID N° 17:

20 5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCTCATGAGCCATAT
TCAACGGGA-3'

SEQ ID N° 18:

5'-CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAGAAAAACT
CATCGAGCA-3'

25 El p-nitrofenol se usa ampliamente como un sustrato para analizar simplemente la actividad de diversas enzimas, incluyendo α -glucosidasa, β -glucosidasa, lipasa y fosfatasa y así también se puede usar como un sustrato marcador fenólico muy útil en el circuito genético identificador de fenol de la presente invención. En la presente invención, a fin de mejorar la capacidad de pGESS para identificar p-nitrofenol, se construyó del siguiente modo pGESS-EGFP(III) que contenía dmpR mutante (que comprende una sustitución de ácido glutámico (E) por lisina (K) en la posición 135 de la secuencia de aminoácidos de dmpR).

35 Específicamente, la secuencia de ADN de dmpR se cambió de modo que el residuo de aminoácido ácido glutámico en la posición 135 se pudiera reemplazar por lisina, después de lo cual el residuo de aminoácido se extendió en 20 pb en ambas direcciones. La secuencia de 40 pb resultante se sometió a mutación puntual usando cebadores de PCR de SEQ ID N°: 19 y SEQ ID N°: 20. Se realizó PCR inversa usando el plásmido pGESS-EGFP(II) como ADN de plantilla usando los dos cebadores. La reacción de PCR inversa se realizó usando ADN polimerasa KOD (Novagen, EE. UU. de A.) bajo las siguientes condiciones, obteniendo de ese modo un producto de PCR de 6.171 pb: predesnaturalización a 94°C durante 3 min. y a continuación 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, renaturalización del cebador a 55°C durante 30 s y síntesis de ADN a 72°C durante 60 s, seguido por extensión final a 72°C durante 5 min. El producto de PCR preparado se trató con proteinasa K, se purificó con una columna (Qiagen, Alemania) y a continuación se trató con *Dpn* I (Roche, Alemania), retirando de ese modo el plásmido usado como el ADN de plantilla. A continuación, la muestra se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa y solo se recogió la banda deseada, se purificó con una columna (Qiagen, Alemania) y a continuación se transformó en *E. coli*

DH5 α (ElectroMaxTM-DH5 α -ETM, Invitrogen, EE. UU. de A.), construyendo de ese modo pGESS-EGFP(III) de 6.171 pb.

SEQ ID N° 19:

5'-GATCGACTCCTTCGAGGTGAAAATCTGCCAGACCGACCTG-3'

5 SEQ ID N° 20:

5'-CAGGTCGGTCTGGCAGATTTTCACCTCGAAGGAGTCGATC-3'

Ejemplo 2: Selección del hospedador óptimo *E. coli* para el circuito genético artificial

En la presente invención, a fin de que pGESS funciones como se pretende, *dmpR* de *Pseudomonas* se debe expresar heterológicamente a un nivel adecuado y debe interactuar suavemente con regulador de la transcripción dependiente de *E. coli* σ^{54} (Sze y cols., (1996) *J. Bacteriol.* 178(13): 3727-3735). Así, la propiedad de señalización de pGESS puede variar dependiendo de las propiedades biológicas y las condiciones de crecimiento de los microorganismos hospedadores. En la presente invención, a fin de incorporar el circuito genético identificador de fenol de un modo estable, se examinaron las influencias por i) la diferencia entre microorganismos hospedadores y ii) el punto temporal de inducción de la expresión por la adición de fenol, para determinar las condiciones óptimas.

En primer lugar, en este experimento, se examinaron las sensibilidades al fenol de cepas de *E. coli* (DH5 α , EPI300, JM109(DE3), BL21 y BL21(DE3)) que contenían el circuito genético artificial, para seleccionar una cepa bacteriana apropiada. Específicamente, se preparó medio sólido LB que contenía 100 μ M de fenol y 50 μ g/ml de ampicilina y cada una de las cepas de *E. coli* (DH5 α , EPI300, JM109(DE3), BL21, BL21(DE3)) que contenía pGESS-EGFP(I) y una cepa EPI300 que contenía pGESS-Cm(II) como un control se cultivó sobre el medio sólido a 30°C durante 36 horas. La FIG. 9A Muestra la reacción del circuito genético en cada cepa sobre el medio sólido. Como se puede observar en la presente, las cepas de tipo B BL21 y BL21(DE3) mostraban sensibilidades superiores al circuito genético que las otras cepas. A continuación, se examinó la sensibilidad de cada cepa de *E. coli* a fenol en medio líquido. Específicamente, cada una de las cepas precultivadas se añadió a medio líquido LB (que contenía 50 μ g/ml de ampicilina) a una concentración de 1% (v/v) y a continuación se cultivó con agitación a 37°C durante 8 horas. Se añadieron 100 μ M de fenol a cada uno de los cultivos, que a continuación se cultivaron con agitación a 30°C durante 20 horas, induciendo de ese modo la expresión de fluorescencia. El análisis de fluorescencia en cada cultivo se realizó del siguiente modo. 1,5 ml de cada una de las cepas cultivadas se centrifugaron y se lavaron una vez con tampón de PBS y se añadieron a los mismos 0,5 ml de solución *celLytic B* (Sigma, EE. UU. de A.), 0,2 mg/ml de lisozima (Sigma, EE. UU. de A.) y 2 unidades de DNase I (Roche, Alemania). A continuación, las células se dejaron reposar a 37°C durante 1 hora y así se sometieron a lisis. Las células sometidas a lisis se centrifugaron y se midió la intensidad de fluorescencia del sobrenadante a una longitud de onda de 510 nm con un espectrómetro de fluorescencia (Varian, Australia) (véase la FIG. 9B). Como resultado, también se obtuvieron en el cultivo líquido los mismos resultados que en el cultivo sólido.

Posteriormente, se examinó la reactividad con fenol del circuito genético de GESS según el momento de adición del fenol y el estado de crecimiento celular. Específicamente, se inoculó una sola colonia de *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-EGFP(I) en medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina y se cultivó con agitación a 37°C durante la noche. Cada una de las cepas precultivadas se inoculó en 100 ml de medio líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina a una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 37°C durante 14 horas, mientras se extraían a intervalos de 2 horas 5 ml del cultivo. Se midió la absorbancia a 600 nm de una porción del cultivo extraído para confirmar el crecimiento celular y se añadieron 100 μ M de fenol al resto del cultivo extraído y a continuación se dejó reaccionar a 30°C durante 20 horas, después de lo cual se analizó la expresión de fluorescencia en el cultivo. Para analizar la fluorescencia, las células se homogeneizaron y la fluorescencia del sobrenadante se analizó usando un espectrómetro de fluorescencia. Como resultado, como se puede observar en la FIG. 9C, la intensidad de fluorescencia era más de 10 veces diferente entre las fases de crecimiento celular y particularmente, cuando el fenol se añadía en la fase estacionaria, la expresión del circuito genético era la más alta. Estos resultados eran coherentes con las propiedades de expresión de σ^{54} .

Ejemplo 3: Verificación del sistema del circuito genético artificial y análisis cuantitativo de señales para compuestos fenólicos

1) Análisis cuantitativo de la señal fluorescente del circuito genético artificial para fenol

A fin de analizar cuantitativamente la función del circuito genético artificial (construido en el Ejemplo 1) para identificar fenol, una sola colonia de *E. coli* BL21 recombinante que contenía pGESS-EGFP(I) se inoculó en medio LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El cultivo se diluyó 10⁶ veces y 100 μ l de la dilución se sembraron sobre medio sólido que contenía 50 μ g/ml de ampicilina y 1-1.000 μ M de fenol y se cultivó a 30°C durante 36 horas, después de lo cual se observó la expresión de fluorescencia en la colonia

con un microscopio de fluorescencia. El microscopio de fluorescencia era AZ100M (Nikon, Japón) y las imágenes se obtuvieron usando una cámara de CCD (DS-Qi1Mc, Nikon) y un conjunto de filtros de fluorescencia (GFP-HQ, Nikon) (Ex 455-485 nm, DM 495, BA 500-545) y las imágenes obtenidas se procesaron usando el software NIS-Elements.

5 Como resultado, como se puede observar en la FIG. 10A, no se observaba fluorescencia en una muestra que no contuviera fenol, mientras que se observaba fluorescencia en la muestra que contenía más de 1 μM de fenol. Además, la intensidad de fluorescencia se incrementaba a medida que se incrementaba la concentración de fenol.

10 La dependencia de la sensibilidad del circuito genético artificial con la concentración del fenol inductor se confirmó usando un espectrómetro de fluorescencia. Con este propósito, una sola colonia de *E. coli* recombinante que contenía pGESS-EGFP(I) se inoculó en medio líquido LB complementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El precultivo anterior se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y diversas concentraciones (0,1-1.000 μM) de fenol hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 30°C durante 20 horas. Para analizar la intensidad de fluorescencia, las células se homogeneizaron y se analizó la intensidad de fluorescencia en el sobrenadante usando un espectrómetro de fluorescencia. Como resultado, como se puede observar en la FIG. 10B, se observaba una señal fluorescente clara a una concentración de fenol de 10 μM o más y la intensidad de fluorescencia se incrementaba en proporción a la concentración de fenol hasta 1.000 μM . Tales resultados indican que el circuito genético identificador de fenol de la presente invención se activa cuantitativamente en el intervalo de concentración de fenol de 1 a 1.000 μM .

Además, el análisis cuantitativo de fenol del circuito genético artificial se realizó mediante FACS. Una sola colonia de *E. coli* DH5a recombinante que contenía pGESS-EGFP(II) se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El cultivo se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 37°C durante 6 horas y 2 ml del cultivo se distribuyeron en cada tubo de ensayo. Se añadieron a cada tubo de ensayo 0-5.000 μM de fenol y el cultivo se cultivó con agitación a 30°C durante 18 horas, induciendo de ese modo la expresión de fluorescencia en el cultivo. La intensidad de fluorescencia inducida por cada concentración de fenol se analizó mediante el sistema FACS Calibur (Becton Dickinson, EE. UU. de A.). Como detector, se estableció un detector de FSC, SSC, FL1-H (excitación = 488 nm, emisión = 530/30 nm) y los datos obtenidos al observar 10.000 células de muestra se analizaron usando CellQuest Pro (Becton Dickinson, EE. UU. de A.). Como resultado, como el caso de los resultados de análisis mediante el microscopio de fluorescencia y el espectrómetro de fluorescencia, la intensidad de fluorescencia se distinguía definitivamente entre la presencia y la ausencia de fenol y se incrementaba a medida que se incrementaba la concentración de fenol (véase la FIG. 10C). El FACS que puede identificar la señal que se describe anteriormente tiene una mayor importancia que otros métodos de análisis, debido a que la investigación de la evolución molecular y el análisis de alto rendimiento de una biblioteca metagenómica se pueden realizar usando las funciones de análisis de alto rendimiento y clasificación del FACS.

Posteriormente, los circuitos genéticos (pGESS-Cm(II), pGESS-Tc(II) y pGESS-Km(II)) que comprendían el gen de resistencia a antibiótico como el indicador se usaron para realizar un análisis cuantitativo de resistencia a antibiótico. Una sola colonia de *E. coli* JM109(DE3) que contenía cada circuito genético que comprendía gen de resistencia a cloranfenicol, tetraciclina o kanamicina como un indicador se inoculó en medio líquido que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El precultivo se diluyó 10^6 veces y 100 μl de la dilución se sembraron en cada uno de los medios selectivos y se cultivaron durante la noche a 37°C durante 3 días. El número de colonias producidas sobre el medio sólido se contó, realizando de ese modo la prueba de resistencia. Se añadieron a cada medio selectivo 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y diversas concentraciones (0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los antibióticos selectivos (resistencia a cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina). Además, se añadió un activador de la transcripción, esto es, fenol, a una concentración de 1-1.000 μM .

50 Como resultado, en el caso de pGESS-Cm(II) que comprende gen de resistencia a cloranfenicol como el indicador, la resistencia a cloranfenicol variaba dependiendo de la concentración de fenol. Particularmente, a una concentración de fenol de 10 μM , pGESS-Cm(II) mostraba resistencia a 20 $\mu\text{g/ml}$ o menos de cloranfenicol. Para referencia, cuando la concentración de fenol se incrementaba hasta 100 μM y 1 mM, las resistencias a cloranfenicol se incrementaban hasta 40 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En el caso de pGESS-Tc(II) que comprendía gen de resistencia a tetraciclina como un indicador, se podían observar resultados cuantitativos similares a los del caso del cloranfenicol. Tales resultados sugieren que los circuitos genéticos identificadores de fenol de la presente invención se pueden usar eficazmente para el análisis cuantitativo de la actividad enzimática. Sin embargo, en el caso de pGESS-Km(II) que comprende gen de resistencia a kanamicina como un indicador, no se identificaba formación de colonias. Así, se encontró que el gen de resistencia a cloranfenicol o el gen de resistencia a tetraciclina se usa más preferiblemente como un indicador que pueda identificar concentraciones de fenol finas (véase la FIG. 10D).

2) Análisis de señales de un circuito genético artificial para diversos fenoles

Se examinaron si el circuito genético artificial identifica los siguientes derivados de fenol y las sensibilidades del circuito genético a los derivados de fenol: o-nitrofenol, m-nitrofenol, p-nitrofenol, o-clorofenol, m-clorofenol, p-clorofenol, ácido salicílico, 2-aminofenol, 2-metoxifenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, catecol, resorcinol, 2-fluorofenol, 2-yodofenol, 2,4-dimetilfenol, 2,5-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, 2,3-dimetilfenol, 3,5-dimetilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,5-diclorofenol, 2,3-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 3,4-diclorofenol, 3,5-diclorofenol, 2,4-dinitrofenol, 3-metilcatecol, 2-etilfenol, 3-etilfenol y benceno. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-EGFP (I) se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó durante la noche a 37°C. El cultivo se inoculó en medio LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó a 37°C durante aproximadamente 8 horas hasta que la OD₆₀₀ de las células alcanzaba 3. A continuación, 100 μM de cada uno de los derivados de fenol se añadieron al cultivo, que a continuación se cultivó con agitación a 30°C durante 18 horas. Se extrajeron 100 μl de cada cultivo y la distribución de fluorescencia en células individuales se examinó mediante FACS. Cada una de las muestras se probó tres veces y las medidas se promediaron. Como resultado, como se puede observar en la FIG. 11A, el circuito genético artificial respondía fuertemente a 10 compuestos, incluyendo o-clorofenol, o-nitrofenol, 2-aminofenol, 2-metoxifenol, catecol, o-cresol, m-cresol, 2-etilfenol, 2-fluorofenol y 2-yodofenol, entre los 31 compuestos usados en el experimento y respondía débilmente a m-clorofenol, p-clorofenol, m-nitrofenol, 2,5-dimetilfenol, 2,3-dimetilfenol, 2,5-diclorofenol, 2,3-diclorofenol y p-cresol y no respondía a p-nitrofenol, sugiriendo que el circuito genético artificial respondía débilmente o no respondía a los compuestos que contenían el sustituyente ligado a la posición para del fenol.

En el caso del circuito genético artificial que comprende gen de resistencia a cloranfenicol como el indicador, se examinó si el circuito genético responde a los sustratos. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* EPI300 que contenía pGESS-Cm (II) se inoculó en medio líquido que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El cultivo se inoculó en 50 $\mu\text{g/ml}$ de medio líquido LB que contenía ampicilina hasta una concentración de 1% (v/v) y a continuación se añadieron a esto 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y 100 μM de cada uno de los derivados de fenol y las células se cultivaron con agitación a 37°C durante 8 horas. A continuación, se midió la OD₆₀₀ de las células, examinando de ese modo si el circuito genético respondía a los derivados de fenol. Como un grupo de control, se usaron células que contenían 100 μM de fenol sin contener cloranfenicol.

Como resultado, el circuito genético artificial que contenía gen de resistencia a cloranfenicol como el indicador respondía fuertemente a o-clorofenol, m-clorofenol, o-nitrofenol, m-nitrofenol, catecol, 2-metoxifenol, o-cresol, m-cresol, 2-fluorofenol, 2-yodofenol, 2,3-dimetilfenol y 2-etilfenol, similar al uso de la proteína de fluorescencia, pero respondía débilmente o no respondía a los compuestos que comprendían el sustituyente ligado en la posición para del fenol, por ejemplo, p-cresol, p-clorofenol y p-nitrofenol (véase la FIG. 11B).

Como resultado, se mostraba que el nivel de expresión de la proteína de fluorescencia, esto es, el grado de activación del circuito genético identificador de fenol, variaba dependiendo del tipo y la posición de la cadena lateral de los derivados de fenol (véase la FIG. 11C).

3) Análisis cuantitativo de señales del circuito genético artificial para diversos fenoles

Las señales del circuito genético artificial para compuestos fenólicos se analizaron cuantitativamente. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-EGFP (I) se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El cultivo se inoculó en medio LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina hasta una concentración de 1% (v/v) y se añadieron a esto 0,1-1.000 μM de cada uno de fenol, o-clorofenol, m-clorofenol, o-nitrofenol, catecol y resorcinol y se cultivaron con agitación durante la noche a 30°C. Las células se sometieron a lisis y el sobrenadante se analizó mediante un espectrómetro de fluorescencia (Varian, Australia), midiendo de ese modo la fluorescencia de GFP a 510 nm. Como resultado, para el o-clorofenol, la fluorescencia se identificaba incluso a una concentración de 0,1 μM y para el fenol y el m-clorofenol, la fluorescencia se empezaba a identificar desde una concentración de 1 μM . Además, para el catecol, o-nitrofenol y el resorcinol, la fluorescencia se empezaba a identificar a partir de concentraciones de 10 μM , 10 μM y 100 μM , respectivamente (véase la FIG. 12A). Los resultados anteriores sugieren que la intensidad de fluorescencia varía dependiendo del tipo o la posición del sustituyente y que se pueden usar selectivamente diversos sustratos fenólicos a fin de asegurar intervalos de medida adecuados.

El análisis cuantitativo del circuito genético artificial para derivados de fenol se realizó usando resistencia a antibiótico. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-Cm (II) se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. Se añadieron 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 20 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol a medio líquido LB y se añadieron al medio LB 0-1.000 μM de cada uno de fenol, o-clorofenol, o-cresol, 2-aminofenol, ácido salicílico, o-nitrofenol, 2-metoxifenol y catecol. A continuación, las células cultivadas se inocularon en el medio líquido LB y se cultivaron a 37°C durante 18 horas y se observó si las células crecían. Como resultado, en caso de que se usara como el indicador el gen de resistencia a

cloranfenicol, el crecimiento de las células varaba dependiendo del tipo o la posición del sustituyente, similar al caso del indicador de GFP (véase la FIG. 12B).

4) Análisis cuantitativo de señales del circuito genético artificial para agua residual fenólica

5 A fin de analizar cuantitativamente el circuito genético identificador de fenol pGESS-EGFP (I), se intentó el análisis de la concentración de compuestos fenólicos en agua residual que contenía diversos compuestos fenólicos. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-EGFP (I) se inoculó en medio de cultivo M9 que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se cultivó durante la noche a 37°C. A continuación, el cultivo se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina hasta una concentración de 1% (v/v), agua residual de coque (Shanghai, China) se diluyó 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ veces, se añadió al cultivo y se dejó reaccionar a 30°C durante 24 horas. A continuación, las células se sometieron a lisis y el sobrenadante se analizó con un espectrómetro de fluorescencia (Varian, Australia), midiendo de ese modo la fluorescencia de GFP a 510 nm (véase la FIG. 13A). Como un control, se añadió 0,1-1.000 μM de fenol en lugar de agua residual de coque y se probó del mismo modo que se describe anteriormente (véase la FIG. 13B).

15 Como resultado, se podía observar que la intensidad de fluorescencia se incrementaba en proporción a la concentración de agua residual añadida. Cuando la intensidad de fluorescencia se comparaba con el caso en el que se añadía fenol como el control, se podía estimar que el residuo de coque contendría aproximadamente 10 mM (aproximadamente 940 ppm) de compuestos fenólicos. Tales resultados eran coherentes con los resultados del análisis por GC/MS que indicaban que el agua residual contenía fenol, 2-metilfenol, 3-metilfenol, 2-nitrofenol, 3,5-dimetilfenol y 2,4-dimetilfenol en cantidades de 667,4 ppm, 31,9 ppm, 165,8 ppm, 8,7 ppm, 19,9 ppm y 5,6 ppm (véase la FIG. 13C). Así, se encontró que el circuito genético identificador de fenol de la presente invención se puede usar para generar señales cuantitativas proporcionales a las concentraciones de componentes fenólicos.

Ejemplo 4: Uso del circuito genético artificial para identificar la actividad enzimática intracelular de un gen extraño

1) Uso de un circuito genético artificial para identificar una actividad enzimática

25 El circuito genético GESS se usó para identificar las actividades de β -galactosidasa de *E. coli*, tirosina-fenol liasa (TPL) de *C. freundii* y metil-parationa hidrolasa (MPH) de *Pseudomonas* sp.

30 Según se describe anteriormente, cuando se usa como un sustrato fenil- α/β -glucósido que comprende glucósido conectado al grupo hidroxilo del fenol, puede identificar diversas actividades enzimáticas de α/β -glucosidasa. En la presente invención, una sola colonia de *E. coli* EPI300 (Epicentre, EE. UU. de A.) que comprendía un vector pCC1FOSTM que contenía el circuito genético pGESS-GFP_{uv} (I) y el gen lacZ de *E. coli* (actividad de β -galactosidasa) se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. Se inocularon 10 ml del precultivo en medio líquido LB que tenía la misma composición que anteriormente hasta una concentración de 1% (v/v) y se añadieron a esto 0,1 mM de fenil- β -glucósido como un sustrato marcador fenólico y se incubaron a 30°C durante 20 horas, después de lo cual se midió la expresión de fluorescencia en las células con un espectrómetro de fluorescencia. Como resultado, en las células que tienen actividad de β -galactosidasa, se observó la fluorescencia de GFP, pero no se observó fluorescencia en las células que no tenían actividad de β -galactosidasa. Esto sugiere que el circuito genético pGESS de la presente invención se puede usar para identificar actividad enzimática de β -galactosidasa (véase la FIG. 14A).

40 El circuito genético GESS de la presente invención también se puede usar para identificar una reacción (fenol-liasa) de liberación de fenol de sustratos (Ph-C-(R)) que comprende carbono acoplado a fenol. En la presente invención, se examinó si el circuito genético GESS identifica la actividad de TPL (enzima que degrada tirosina en fenol, ácido pirúvico y amoníaco) a fin de verificar la eficacia de TPL. Específicamente, el gen TPL de *C. freundii* se clonó en pEC11a (obtenido al reemplazar el ori de pET11a(+)) por ori de ACYC) para preparar pEC-TPL que a continuación se introdujo en *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-EGFP (I).

50 Una sola colonia de *E. coli* DH5 α se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. Se añadieron 1 mM de IPTG (isopropil-tio- β -D-galactopiranosido), 1 mM de tirosina y 10 μM de PLP a medio líquido LB que tenía la misma composición que anteriormente, y el precultivo se añadió al medio líquido LB hasta una concentración de 1% (v/v) y se incubó a 30°C durante 20 horas, después de lo cual se midió la expresión de fluorescencia en las células con un espectrómetro de fluorescencia. Como resultado, la intensidad de fluorescencia en la lisis celular se incrementaba significativamente debido a la actividad de TPL, sugiriendo que la tecnología de identificación de la actividad de la presente invención también es útil para el análisis de fenol-liasa (véase la FIG. 14B).

55 Además, se encontró que la tecnología de GESS de la presente invención también puede identificar la actividad de MPH que degrada organofosfato, un insecticida de amplio espectro. Específicamente, el gen MPH se introdujo en *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-EGFP (III) mediante electroporación y las células se precultivaron durante la noche

del mismo modo que en el caso de TPL descrito anteriormente. A continuación, se añadieron al cultivo 0,1 mM de metil-parationa, un compuesto marcador fenólico que es un sustrato de MPH y se examinó si el circuito genético identificaba p-nitrofenol producido por la degradación del sustrato. Las células se sometieron a lisis y el sobrenadante se analizó con un espectrómetro de fluorescencia (Varian, Australia), examinando de ese modo si la longitud de onda de emisión de GFP se detectaba a 510 nm. Como resultado, no se observó fluorescencia en el control que no degradaba metil-parationa, pero se observó una fluorescencia fuerte en presencia de MPH (metil-parationa hidrolasa) (véase la FIG. 14C).

2) Obtención de imágenes de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia y análisis de resistencia a antibióticos para identificar una actividad enzimática usando un circuito genético artificial.

Se observó identificación de actividad enzimática por el circuito genético GESS mediante imágenes de fluorescencia. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* recombinante que contenía el gen TPL y pGESS-EGFP (I) se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El precultivo se diluyó 10⁶ veces y 100 µl de la dilución se sembraron en estrías sobre medio sólido LB que contenía 1 mM de tirosina, 10 µM de PLP y 50 µg/ml de ampicilina y se cultivó a 30°C durante 36 horas. A continuación, la imagen de fluorescencia de las colonias se observó con un microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón). Como un control, una colonia de *E. coli* que contenía pGESS-EGFP (I) sin contener gen TPL se probó y se observó del mismo modo que anteriormente. Como resultado, no se observaba fluorescencia en ausencia del gen TPL, pero se observaba una imagen de la colonia de *E. coli* que contenía pGESS-EGFP (I) en presencia del gen TPL (véase la FIG. 15A).

Resultados similares a estos también se podían observar en el caso en el que la actividad enzimática de una muestra líquida se analizaba mediante clasificación por FACS. Específicamente, se comparó la actividad entre *E. coli* recombinante que contenía el gen TPL y pGESS-EGFP (I) y *E. coli* recombinante de control que contenía pGESS-EGFP (I) sin el gen TPL. Para este propósito, cada colonia se inoculó en medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El precultivo se inoculó en medio líquido LB que contenía 1 mM de tirosina, 10 µM de PLP (5'-fosfato de piridoxal) y 50 µg/ml de ampicilina hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 30°C durante 20 horas. La medida de la fluorescencia en las células cultivadas se realizó usando el sistema FACSaria (Becton Dickinson, EE. UU. de A.). Como resultado, la distribución de fluorescencia en la muestra celular que contenía TPL se desplazó hacia la derecha en comparación con la distribución de fluorescencia en la muestra celular que no contenía TPL, indicando que la intensidad de fluorescencia en la muestra celular que contiene TPL era superior (véase la FIG. 15B).

La identificación de actividad enzimática mediante el circuito genético GESS se observó mediante resistencia a antibiótico. Específicamente, una sola colonia de *E. coli* recombinante que contenía gen TPL y pGESS-Tc (II) se inoculó en medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El cultivo se diluyó 10⁶ veces y 100 µl de la dilución se sembraron sobre medio sólido LB que contenía 1 mM de tirosina, 10 µM de PLP, 100 µg/ml de ampicilina y 20 µg/ml de tetraciclina y se cultivó a 30°C durante 36 horas, después de lo cual se observó el patrón de proliferación de las colonias. Como un control, el mismo precultivo que anteriormente se sembró sobre medio sólido que no contenía tetraciclina y se observó. Como resultado, cuando no había tetraciclina, el circuito genético de GESS no tenía selectividad y así proliferaba en todo el medio, pero cuando existía tetraciclina, solo podrían sobrevivir colonias que producían fenol por la degradación enzimática del sustrato. Así, se podría observar la sensibilidad selectiva de GESS en la medida de la actividad enzimática (véase la FIG. 15C).

Los resultados de la prueba anterior mostraban que el sistema GESS puede alcanzar la identificación de actividad enzimática usando medio líquido o sólido y puede realizar un análisis de alto rendimiento de actividad enzimática usando no solo proteína de fluorescencia sino también proteína de resistencia a antibiótico como un indicador.

3) Verificación de la capacidad cuantitativa del circuito genético artificial (GESS)

Se examinó si se pueden analizar cuantitativamente diferentes actividades enzimáticas usando el GESS. Como enzimas, se usaron tirosina-fenol liasa (TPL(C)) de *Citrobacter freundii* y tirosina-fenol liasa (TPL(S)) de *Symbiobacterium toebii* y, como un control, se usó *E. coli* que no contenía enzima. El valor de la actividad enzimática medido usando pGESS se comparó con el valor de la actividad enzimática medido usando HPLC, determinando de ese modo la significación.

Específicamente, cada uno de TPL(C) y TPL(S), contenido en un vector psHCE (obtenido al tratar pSTV28 (Takara, Japón) con *Cla* I y *Tth*111 I y a continuación insertar un promotor de HCE procedente de pHCEIIB (Takara, Japón) y un terminador de la transcripción en el pSTV28) y un vector psHCE de control que se transformaba en *E. coli* DH5α, preparando de ese modo cepas que tienen actividad enzimática. Cada colonia se inoculó en medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. El cultivo se inoculó en medio líquido M9 que contenía 1 mM de tirosina, 10 µM de PLP (5'-fosfato de piridoxal), 50

µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 37°C durante 12 horas. El crecimiento de las células bacterianas se predijo al medir la absorbancia (OD₆₀₀) usando un espectrómetro UV/VIS (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Suecia) y la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placas de fluorescencia (Multi-label reader, PerkinElmer, EE. UU. de A.).

Para medir la actividad enzimática, se prepararon células de siembra, después de lo cual se inocularon en medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivaron a 37°C durante 24 horas. Las células se recuperaron del medio de cultivo mediante centrifugación (5.000 rpm, 10 min.) y se lavaron una vez con tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Las células se sometieron a lisis completamente usando un homogeneizador ultrasónico (método: 3 s de homogeneización, 3 s de interrupción, 20% de intensidad durante 3 min.; Vibra cell, Sonics, EE. UU. de A.). Para realizar una reacción enzimática, se añadieron 1 mM de tirosina y 100 µM de PLP a la lisis celular (1 mg/ml) en fosfato potásico 100 mM (pH 8,0) y se incubaron a 37°C durante 12 horas. La actividad enzimática se midió mediante HPLC (SCL-10A vp, Shimadzu, Japón) usando una columna inversa C18 (C/N. 18R03, Chemco Pak, Japón) y acetonitrilo-agua 50:50 como tampón.

La FIG. 16A muestra las actividades de TPL(C), TPL(S) y psHCE analizadas mediante pGESS. Como se puede observar en la misma, la actividad de TPL(C) era aproximadamente 2,5 veces mayor que la de TPL(S). Después de la reacción enzimática, se compararon las producciones de fenol analizadas usando HPLC (véase la FIG. 16B). Como los resultados de pGESS, la actividad de TPL(C) era aproximadamente 2,5 veces mayor que la de TPL(S). Tales resultados indican que se puede usar pGESS para analizar cuantitativamente enzimas que tienen diversas actividades enzimáticas.

Ejemplo 5: Optimización del medio y los nutrientes (fuentes de carbono) para incrementa la capacidad para identificar fenol

En el circuito genético artificial según la presente invención, la proteína reguladora de la enzima que degrada un compuesto fenólico que es una proteína reguladora de la transcripción depende de σ^{54} y se sabe que las condiciones nutritivas de los medios o las cepas influyen en la capacidad de los circuitos genéticos artificiales para identificar fenol (Sze y cols., (1996) *J. Bacteriol.* 178: 3727-3735). A fin de optimizar la capacidad para identificar fenol, se examinó la sensibilidad según las condiciones nutritivas de los medios y se examinó la sensibilidad según los nutrientes (fuentes de carbono), seleccionado de ese modo un medio óptimo.

En primer lugar, se examinaron el crecimiento celular y la intensidad de fluorescencia (sensibilidad) según las condiciones nutritivas. Como una cepa, se usó *E. coli* DH5 α transformada con pGESS-EGFP (II) construido en el Ejemplo 1 y como medio, se usaron medios LB (por litro, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl) y M9 (por litro, 12,8 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl, 2 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂, 0,4% (p/v) de glucosa, 0,01% (p/v) de tiamina). Se añadieron a cada medio 0,1 mM de fenol para inducir la expresión de fluorescencia del circuito genético artificial (pGESS-EGFP). Para sanear la cepa inoculada, la cepa se inoculó en medio LB y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C. Al día siguiente, el precultivo se inoculó en medio LB hasta una concentración de 3% (v/v) y se cultivó durante aproximadamente 2 horas (OD₆₀₀/ml = 0,3-0,4), preparando de ese modo la cepa en la fase exponencial inicial. El cultivo de la cepa preparado se inoculó en medio LB o M9 que contenía 0,1 mM de fenol hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 30°C. Cada medio se complementó con 50 µg/ml de ampicilina como un marcador selectivo. Durante el procedimiento de cultivo, el cultivo se muestreó a intervalos de tiempo dados y se examinaron el crecimiento celular y la intensidad de fluorescencia del mismo. El crecimiento celular se predijo al medir la absorbancia (OD₆₀₀) usando un espectrómetro UV/VIS (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Suecia) y la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placas de fluorescencia (Multi-label reader, PerkinElmer, EE. UU. de A.). Como resultado, el crecimiento celular era mejor en el medio LB (véase la FIG. 17A), pero la intensidad de fluorescencia (sensibilidad) del circuito genético artificial de la presente invención era superior en el medio M9 (véase la FIG. 17B).

En segundo lugar, se examinaron el crecimiento celular y la intensidad de fluorescencia (sensibilidad) según los nutrientes (fuentes de carbono) del medio M9. Como una cepa, se usó *E. coli* DH5 α transformada con pGESS-EGFP (II) y, como medio basal, se usó medio M9 (12,8 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂, 0,01% (p/v) de tiamina). Como fuentes de carbono, se añadieron cada uno de glucosa, glicerol, succinato Na y acetato Na al medio M9 a la misma concentración de 0,4% (p/v). Se añadió al medio 0,1 mM de fenol para inducir la expresión de fluorescencia del circuito genético. Antes de un día, la colonia se inoculó en medio LB y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C y, al día siguiente, el cultivo se inoculó en medio LB hasta una concentración de 3% (v/v) y se cultivó durante aproximadamente 2 horas (OD₆₀₀/ml = 0,3-0,4), preparando de ese modo la cepa en la fase exponencial inicial. El cultivo de la cepa se inoculó en medio LB o M9 que contenía 0,1 mM de fenol hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 30°C. Cada medio se complementó con 50 µg/ml de ampicilina como un marcador selectivo. Durante el procedimiento de cultivo, el cultivo se muestreó a intervalos de tiempo dados y se examinaron el crecimiento celular y la intensidad de fluorescencia del mismo. El crecimiento celular se predijo al medir la absorbancia (OD₆₀₀) usando un espectrómetro UV/VIS y la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placas de fluorescencia. Como resultado, el crecimiento celular bacteriano (OD₆₀₀) era el más rápido en el medio que contenía glucosa y era el más alto en el medio que

contenía glicerol (véase la FIG. 18A). La intensidad de fluorescencia (sensibilidad) era la más alta en el medio que contenía acetato, aunque la velocidad de crecimiento era lenta en el medio que contenía acetato (véase la FIG. 18B).

5 Ejemplo 6: Análisis en 2 etapas (etapa de crecimiento-etapa de análisis) de la actividad para incrementar la capacidad para identificar fenol

10 En la presente invención, a fin de incrementar a capacidad del circuito genético para identificar compuestos fenólicos, la reacción del circuito genético se realizó usando el medio y la fuente de carbono óptimos seleccionados en el Ejemplo 5 y la etapa de crecimiento celular y la etapa de activación (análisis) del circuito genético se separaron entre sí, intentando de ese modo la optimización del sistema de identificación. Específicamente, las células bacterianas se sanearon usando medio LB durante el crecimiento y las células se recuperaron y la actividad del circuito genético en las mismas se analizó en el medio M9 que contenía acetato como una fuente de carbono.

15 En primer lugar, se realizó un examen sobre una fase de crecimiento a la que las células bacterianas se van a convertir durante el cultivo celular sobre medio LB. Como una cepa, se usó una cepa de *E. coli* DH5 α introducida con tirosina fenol-liasa que degrada L-tirosina a fin de inducir una reacción enzimática que libera fenol y, como un control, se usó cepa de *E. coli* DH5 α que no contenía tirosina fenol-liasa. Las dos cepas se introdujeron con el circuito genético (pGESS-EGFP (II)). Específicamente, las cepas se construyeron del siguiente modo. El gen TPL (GenBank: X66978,1) de *C. freundii* se clonó en psHCE para preparar psHCE-TPL que a continuación se introdujo en *E. coli* DH5 α transformada con pGESS-EGFP (II) construido en el Ejemplo 1.

20 La cepa se inoculó en medio LB y se cultivó con agitación a 37°C y, al día siguiente, el cultivo se inoculó en medio LB hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 37°C, mientras las células se recuperaban en diversos momentos. Usando las células recuperadas, se realizó la activación del circuito genético. Para la activación de la activación genética, las células bacterianas recuperadas se lavaron una vez con medio M9 y se suspendieron en medio M9 (acetato) que contenía 1 mM de tirosina y 10 μ M de PLP (5'-fosfato de piridoxal) como sustratos y las células se cultivaron con agitación a 30°C durante 16 horas para realizar la activación del circuito genético. Cada medio se complementó con 50 μ g/ml de ampicilina y 25 μ g/ml de cloranfenicol como marcadores selectivos. La concentración celular se midió usando un espectrómetro UV/VIS y se midió la intensidad de fluorescencia usando un lector de placas de fluorescencia. Como resultado, se encontró que, si las células se recuperaban cuando el crecimiento celular (OD₆₀₀/ml) alcanzaba aproximadamente 1,5-4, la reacción enzimática se realizaba establemente (véase la FIG. 19A).

35 En segundo lugar, se realizó el examen del período durante el cual se va a mantener sobre medio M9 la etapa de activación de la reacción enzimática. Específicamente, se usaron las mismas cepas que anteriormente y, cuando el crecimiento celular (OD₆₀₀/ml) en medio LB alcanzaba aproximadamente 3 (cultivadas durante aproximadamente 6 horas), las células se recuperaban y se sometían a lavado y reacción enzimática como se describe anteriormente. Durante la etapa de activación del circuito genético, las células se muestrearon y se midieron la concentración y la intensidad de fluorescencia de las mismas. La concentración celular se midió usando un espectrofotómetro UV/VIS y la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placas de fluorescencia. Como resultado, se podía observar que el tiempo durante el cual se producía suficientemente la reacción enzimática era 14-16 horas (véase la FIG. 19B).

45 En tercer lugar, se examinó el grado de mejora en la sensibilidad a fenol mediante un análisis de actividad en 2 etapas (etapa de crecimiento-etapa de análisis). Específicamente, una colonia introducida con el circuito genético se inoculó en medio LB y se cultivó con agitación durante la noche a 37°C y, al día siguiente, el cultivo se inoculó en medio LB a una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 37°C. Cuando el crecimiento celular (OD₆₀₀/ml) alcanzaba aproximadamente 2,5, las células cultivadas se recuperaron y se sometieron a la activación del circuito genético. Para la activación del circuito genético, las células bacterianas recuperadas se lavaron una vez con medio M9, después de que se suspendieran en medio M9 (acetato) que contiene diversas concentraciones de fenoles y se cultivaron con agitación a 30°C durante 16 horas. Cada medio se complementó con 50 μ g/ml de ampicilina como un marcador selectivo. La intensidad de fluorescencia en células inducida por cada concentración de fenol se midió usando el sistema FACSAria (Becton Dickinson, EE. UU.). Como un detector, se estableció un detector de FSC, SSC, FL1-H (excitación = 488 nm, emisión = 530/30 nm) y los datos obtenidos por 50.000 células de muestra se analizaron usando FACSDiVa (Becton Dickinson, EE. UU. de A.) (véase la FIG. 19 C).

55 Como resultado, al menos 1 μ M de fenol se podía identificar mediante el análisis de actividad en 2 etapas y el intervalo de concentración de fenol que se podía analizar cuantitativamente mediante el circuito genético estaba en el intervalo de 1-10 μ M, que era aproximadamente 10 veces superior que la sensibilidad previa y el valor de la reacción se incrementaba aproximadamente 5 veces (véase la FIG. 19D).

60

Ejemplo 7: Mejora de la sensibilidad y la especificidad de reconocimiento del circuito genético artificial (GESS)

Según se menciona en los Ejemplos anteriores, a fin de mejorar la sensibilidad del circuito genético a componentes fenólicos, se seleccionaron el medio y la fuente de carbono óptimos y se desarrolló el método en dos etapas (etapa de crecimiento celular y etapa de activación (análisis) del circuito genético), realizando de ese modo la optimización de las condiciones de reacción para el circuito genético. Posteriormente, a fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de reconocimiento del circuito genético, se realizó la mejora del circuito genético artificial. Específicamente, se desarrolló novedosamente un circuito genético (pGESS-EGFP (III)) que comprendía proteína dmpR mutante (E135K) que tenía afinidad incrementada para para-nitrofenol (véase el Ejemplo 1) y se aplicó a las condiciones de reacción optimizadas.

La colonia introducida con el circuito genético pGESS-EGFP (II) o pGESS-EGFP (III) se inoculó en medio LB y se cultivó con agitación a 37°C. Al día siguiente, el cultivo se inoculó en medio LB hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivó con agitación a 37°C. Cuando el crecimiento celular (OD₆₀₀/ml) alcanzaba aproximadamente 2,5, las células cultivadas se recuperaron y se sometieron a la activación del circuito genético. Para la activación del circuito genético, las células bacterianas recuperadas se lavaron una vez con medio M9, después de lo cual se suspendieron en medio M9 (acetato) que contenía diversas concentraciones de fenol y se cultivaron con agitación. Cada medio se complementó con 50 µg/ml de ampicilina como un marcador de selección. El crecimiento celular bacteriano se predijo al medir la absorbancia (OD₆₀₀) usando un espectrómetro UV/VIS (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Suecia) y la intensidad de fluorescencia se midió usando un lector de placas de fluorescencia (Multi-label reader, PerkinElmer, EE. UU. de A.). Como resultado, cuando el circuito genético estaba provisto de dmpR mutante, el intervalo de fenol que se podía identificar cuantitativamente era aproximadamente 0,1-10 µM, lo que era aproximadamente 10 veces mayor que el caso de dmpR silvestre y el intervalo de cuantificación también se incrementaba aproximadamente 10 veces (véase la FIG. 20A).

Posteriormente, se realizó la medida de las sensibilidades a 2-nitrofenol y 4-nitrofenol. La medida se realizó del mismo modo que anteriormente y diversas concentraciones de 2-nitrofenol y 4-nitrofenol además de fenol se añadieron y se dejaron reaccionar. Como resultado, la sensibilidad era la más alta en el fenol y era superior en orden de 4-nitrofenol y 2-nitrofenol y los tres fenoles también se podían identificar cuantitativamente a una concentración de 0,1-10 µM (véase la FIG. 20B).

Ejemplo 8: Cribado de alto rendimiento de gen de tirosina fenol-liasa procedente de una biblioteca genómica de *Citrobacter freundii*

Ya se ha presentado que *Citrobacter freundii*, una cepa bacteriana gramnegativa, contiene tirosina fenol-liasa en su cromosoma (Kiick y cols., (1988) *Biochemistry* 27(19): 7333-7338; Demidkina y cols., (1988) *FEBS Lett.* 232(2): 381-382; Chen y cols., (1993) *Biochemistry* 32(43): 11591-11599). Tirosina fenol-liasa de *Citrobacter freundii*, cuya expresión es inducida por TyrR, tiene una actividad específica de aproximadamente 1,9 (Chen y cols., (1995) *Eur. J. Biochem.* 229(2): 540-549; Lee y cols., (2006) *FEBS J.* 273: 5564-5573). A fin de cribar tirosina fenol-liasa de una biblioteca basada en un vector fosmídico de bajo número de copias, se requiera un sistema de cribado de alta sensibilidad.

En este Ejemplo, a fin de verificar la sensibilidad y la eficacia del método según la presente invención, se intentó el cribado de alto rendimiento de tirosina fenol-liasa de baja actividad procedente de una biblioteca genómica de *Citrobacter freundii* usando el sistema GESS de la presente invención.

La biblioteca genómica de *Citrobacter freundii* fue construida por SolGent Co., Ltd. (Corea) y la diversidad de la biblioteca genómica era aproximadamente $6,5 \times 10^3$. Cuando se supone que el tamaño cromosómico total de *Citrobacter freundii* es aproximadamente 5 Mb, el tamaño de un fragmento cromosómico que se introduce en el vector fosmídico es aproximadamente 30 kb. Así, se consideraba que la biblioteca construida contenía todos los cromosomas totales de *Citrobacter freundii*.

El circuito genético artificial (pGESS-GFP_{uv} (I)) construido en el Ejemplo 1 y la biblioteca genómica construida anteriormente se transformaron secuencialmente en la cepa de E. coli EPI300 (Epicentre, EE. UU. de A.) mediante electroporación, construyendo de ese modo una biblioteca cuyo cribado de alto rendimiento es posible. La biblioteca construida se recuperó en tampón de almacenamiento y se concentró hasta una concentración de aproximadamente 10^{10} células/ml y 0,5 ml se distribuyeron en cada uno de los tubos de 1,5 ml y se almacenaron en un congelador de baja temperatura.

La biblioteca metagenómica almacenada en el congelador de baja temperatura se inoculó en 3 ml de medio LB a una concentración de 1% (v/v) (aproximadamente 10^8 células) y se cultivó a 37°C durante 12 horas, preparando de ese modo una biblioteca sana. El cribado de alto rendimiento se realizó usando medio LB que contenía 1 mM de tirosina y 10 µM de PLP (5'-fosfato de piridoxal). A fin de incrementar el nivel de expresión del gen introducido en el vector fosmídico, 1x solución Copy-control y 50 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol que eran

5 marcadores selectivos se añadieron al medio. El cultivo se diluyó adecuadamente y la dilución se sembró sobre el medio sólido de modo que se produjeran aproximadamente 2-300 colonias (un total de 1.000 colonias). A continuación, las células se cultivaron a 30°C durante 48 horas para inducir reacciones enzimáticas en las células y la expresión de fluorescencia. Las colonias fluorescentes se observaron usando un analizador de imágenes (Gel Doc 2000 gel documentation system, Bio Rad, EE. UU. de A.) y el análisis de las imágenes se realizó usando el programa de análisis de imágenes (Quantity One, Bio Rad, EE. UU. de A.) (véase la FIG. 21A).

10 Como resultado, entre aproximadamente 1.000 colonias, se seleccionaron 7 colonias que se consideraba que tenían fluorescencia. Además, los genes de las colonias se analizaron usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, como resultado, se encontró que 2 colonias contenían gen de tirosina fenol-liasa (véase la FIG. 21B).

15 Cuando se supone que el tamaño cromosómico total de *Citrobacter freundii* es aproximadamente 5 Mb, el tamaño de un fragmento cromosómico que se introduce en el vector fosmídico es aproximadamente 30 kb. Así, se estimó que la probabilidad de que se cribara la tirosina fenol-liasa era 0,6% (6/1.000 clones). La relación real de tirosina fenol-liasa cribada por el sistema GESS era 0,2% (2/1000 clones) que era similar al valor estimado.

20 Así, el uso del sistema GESS según la presente invención permitía el cribado de alta sensibilidad de tirosina fenol-liasa de una sola copia clonada en el vector fosmídico. La probabilidad de aciertos de clones activos no era inferior a la probabilidad estimada, sugiriendo que la tecnología GESS según la presente invención se puede usar eficazmente para cribar genes extraños útiles.

Ejemplo 9: Construcción de una biblioteca metagenómica a partir de suelo contaminado con aceite

25 Para construir una biblioteca metagenómica, una comunidad microbiana (número de registro: KCTC 11077BP) procedente de suelo contaminado con aceite se obtuvo de the Korean Collection for Type Culture, the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. El ADN genómico total se aisló de la comunidad microbiana y se cortó en tamaños adecuados usando un método físico. Los tamaños del ADN genómico cortado se examinaron usando gel de agarosa al 0,4% y, como resultado, se encontró que los fragmentos de ADN genómico tenían diversos tamaños. Los fragmentos de ADN genómico se enrobaron en los extremos usando una mezcla de enzimas reparadora de extremos y se sometieron a electroforesis y ADN con extremos reparados de aproximadamente 30 kb se recuperó del gel y se usó como un fragmento de ADN para construir una biblioteca metagenómica. El fragmento de ADN de aproximadamente 30 kb se ligó con un vector pCC1FOS (Epicentre, EE. UU. de A.) y a continuación se empaquetó con clones fosmídicos usando un extracto de empaquetamiento. El fago empaquetado con los clones fosmídicos se mezcló con *E. coli* EPI300 (Epicentre, EE. UU. de A.) y a continuación se dejó reposar a 37°C durante 45 minutos, induciendo de ese modo la infección del fago. El fago se sembró sobre medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, 1,5 g de agar) que contenía 12,5 µg/ml de cloranfenicol y a continuación se cultivó suficientemente a 37°C durante 30-40 horas. Las células bacterianas se contaron y se calculó el tamaño total de la biblioteca. La diversidad de la biblioteca metagenómica obtenida era aproximadamente 8×10^4 (véase la FIG. 22A).

40 El tamaño total de la biblioteca metagenómica obtenida según el método anterior era aproximadamente 400 Mb. Así, cuando se supone que el tamaño genómico medio de cada cepa microbiana es aproximadamente 4 Mb, se determinaba que la biblioteca metagenómica tenía información de aproximadamente 100 o más genomas.

45 Para confirmar la biblioteca metagenómica total, cinco cepas bacterianas individuales se cultivaron con agitación en medio líquido LB (por litro, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl) que contenía 12,5 µg/ml de cloranfenicol y 1x solución Copy-control (Epicentre, EE. UU. de A.) durante 5 horas, el ADN se aisló de esto y se digirió completamente con *BamH* I y *EcoR* I y los fragmentos de ADN introducidos en los vectores fosmídicos se confirmaron. Los tamaños de los fragmentos de ADN se sumaron y los tamaños de los vectores fosmídicos se restaron. Como resultado, el tamaño de los fragmentos de ADN introducidos en los vectores fosmídicos era aproximadamente 27-35 kb y el tamaño medio era aproximadamente 30 kb (véase la FIG. 22B).

50 Ejemplo 10: Cribado de alto rendimiento de fosfatasa alcalina procedente de metagenoma ambiental

pGESS-GFP_{uv}(I) construido en el Ejemplo 1 se introdujo en la biblioteca metagenómica, construida en el Ejemplo 9, mediante electroporación y se intentó el cribado de alto rendimiento de fosfatasa usando el sistema GESS (véase la FIG. 23).

55 La biblioteca metagenómica introducida con pGESS-GFP_{uv} (I) se concentró hasta una concentración de aproximadamente 10^{10} células/ml en tampón de almacenamiento (por litro, 1 X medio TY (8 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 2,5 g de NaCl), 15% (v/v) de glicerol, 2% (v/v) de glucosa) y se distribuyeron 0,5 ml en cada uno de los tubos de 1,5 ml y se almacenaron en un congelador de baja temperatura.

La biblioteca metagenómica introducida con pGESS-GFP_{uv} (I), almacenada en el congelador de baja temperatura, se inoculó en 10 ml de medio LB a una concentración de 1% (v/v) (aproximadamente 10⁸ células) y se cultivó a 37°C durante 12 horas, preparando de ese modo una biblioteca sana. El cultivo se inoculó en 2 ml de medio LB a una concentración de 1% (v/v) y se cultivó a 37°C hasta que la concentración celular (OD₆₀₀/ml) alcanzaba aproximadamente 2,5-3 (aproximadamente 5-6 horas). A continuación, la biblioteca se recuperó mediante centrifugación (4.000 rpm, 10 min.). La biblioteca se lavó con medio M9 (por litro, 12,8 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl, 2 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂, 0,4% (p/v) de glucosa, 0,01% (p/v) de tiamina) después de la centrifugación (4.000 rpm, 10 min.) y la suspensión. A continuación, a fin de retirar clones positivos falsos que muestran fluorescencia incluso en ausencia de un sustrato, la biblioteca se suspendió en medio M9 que no contenía fosfato de fenilo y se agitó a 30°C durante 16 horas. Cada medio se complementó con 1x solución Copy-control y 50 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol como marcadores selectivos. Después de la agitación, se recuperaron 10⁶ células no fluorescentes excluyendo clones positivos falsos (clones fluorescentes) usando una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (FACSAria, BD, EE. UU. de A., láser violeta de 407 nm, BP Filter 530/30) y se inocularon en medio LB y se cultivaron a 37°C durante 12 horas o más.

Posteriormente, se llevó a cabo un experimento para rastrear candidatos que muestran fluorescencia por el sustrato fosfato de fenilo. Específicamente, las células bacterianas recuperadas se inocularon en 2 ml de medio LB hasta una concentración de 1% (v/v) y se cultivaron a 37°C hasta que la concentración celular (OD₆₀₀/ml) alcanzaba aproximadamente 2,5-3 (durante aproximadamente 5-6 horas), después de lo cual la biblioteca se recuperó mediante centrifugación (4.000 rpm, 10 min.). La biblioteca se lavó con medio M9 después de la centrifugación (4.000 rpm, 10 min.) y la suspensión.

A continuación, la biblioteca se suspendió en medio M9 que contenía 1 mM de fosfato de fenilo y se agitó a 30°C hasta 16 horas, realizando de ese modo una reacción enzimática en las células. Cada medio se complementó con 1x solución Copy-control y 50 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol como marcadores selectivos. Después de la reacción enzimática, el patrón de fluorescencia de la biblioteca fluorescente se analizó mediante FACS y se recuperaron 200 colonias que mostraban fuerte fluorescencia.

A continuación, las colonias recuperadas se sembraron sobre medio sólido complementado con un sustrato y se seleccionaron colonias que mostraban fluorescencia fuerte. Específicamente, las células recuperadas mediante FACS se sembraron sobre medio sólido LB que contenía 1 mM de fosfato de fenilo y se cultivaron a 30°C durante 48 horas para inducir la suficiente expresión de fluorescencia. A fin de incrementar el nivel de expresión de la biblioteca metagenómica introducida en el vector fosmídico, el medio se complementó con 1x solución Copy-control y 50 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de cloranfenicol como marcadores de selección. Las colonias fluorescentes se observaron usando un analizador de imágenes (Gel Doc 2000 gel documentation system, Bio Rad, EE. UU. de A.) y el análisis de las imágenes se realizó usando un programa de análisis de imágenes (Quantity One, Bio Rad, EE. UU. de A.). Como resultado, se produjeron 47 colonias y, entre ellas, se seleccionaron 6 colonias que se estimó que expresaban fluorescencia fuerte.

A fin de verificar la actividad enzimática de los clones aislados, se usó fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) como un sustrato de desarrollo de color. Este sustrato tiene el mismo cromógeno que el de X-gal que se usa frecuentemente en estudios biológicos moleculares y puede reconocer actividad de fosfatasa mediante el desarrollo de color. Los clones seleccionados se sembraron en estrías sobre medio sólido LB complementado con 20 µg/ml de BCIP y se cultivaron a 30°C durante la noche. Se examinó si los clones desarrollaban color y, como resultado, se seleccionó un clon que desarrollaba color.

El clon seleccionado se cultivó en medio LB y se sometió a la misma reacción enzimática que anteriormente y se analizó es espectro de fluorescencia del mismo. Para el análisis de la fluorescencia, las células sometidas a la reacción enzimática se recuperaron mediante centrifugación (4.000 rpm, 10 min.) y se lavaron una vez con tampón de PBS, después de lo cual se añadieron a las mismas CelLytic B (Sigma, EE. UU. de A.), 20 µg/ml de lisozima (Sigma, EE. UU. de A.) y DNAase I (Roche, Suiza) para someter a lisis la pared celular. El residuo celular se sedimentó mediante centrifugación (15.000 rpm, 15 min.) y el sobrenadante se recogió y el espectro de fluorescencia (excitación 385 nm) del mismo se analizó mediante un analizador de fluorescencia (Fluorometer, Varian, Australia). Como resultado, se observó la emisión de fluorescencia a 510 nm y esta fluorescencia era más fuerte que en el grupo de control que tenía el circuito genético solo.

Ejemplo 11: Recuperación y aislamiento de fosfatasa

Se extrajo ADN del clon fosmídico que contiene fosfatasa alcalina seleccionado en el Ejemplo 10, después de lo cual se digirió con enzima de restricción *Not* I y se sometió a electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE). Como resultado, se encontró que un gen de aproximadamente 37-40 kb estaba insertado en el vector fosmídico.

Específicamente, el clon fosmídico se inoculó en medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se confirmó que no existía pGESS-GFP_{uv} (I) en el clon. A continuación, la E. coli EPI300 seleccionada que contenía fosfatasa alcalina se

inoculó en 100 ml de medio líquido LB complementado con 1x solución Copy-control y se cultivó a 37°C durante 5 horas. A continuación, el clon cultivado se recuperó y se aisló ADN del clon recuperado usando midi-prep kit (Qiagen, EE. UU. de A.). El ADN aislado se digirió con la enzima de restricción *Nof I* y se sometió a PFGE, después de lo cual se aisló del mismo un gen de 37-40 kb excluyendo el vector fosmídico. A continuación, el gen se cortó usando una cortadora de ADN (Hydroshear, Gene Machines, EE. UU. de A.) para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 3-7 kb. El fragmento de ADN se recuperó y se fosforiló. Un vector plasmídico pSTV28 (Takara, Japón) digerido con *BamH I* se ligó con el ADN fosforilado y a continuación se insertó en *E. coli* DH10B (Takara, Japón) mediante electroporación, construyendo de ese modo una biblioteca aleatoria. La diversidad de la biblioteca era aproximadamente 4×10^4 . Basándose en el hecho de que el tamaño del gen introducido en el vector fosmídico era aproximadamente 40 kb, se concluyó que la biblioteca contenía toda la longitud del gen interno del clon fosmídico. La biblioteca aleatoria se introdujo en *E. coli* DH5 α que contenía pGESS-GFP_{uv} (I) y 6 clones que tenían actividad de fosfatasa se seleccionaron finalmente mediante una combinación del método de cribado que emplea el circuito genético recombinante (pGESS-GFP_{uv} (I)) y un método de sustrato que desarrolla color (BCIP).

Ejemplo 12: Comparación de la secuencia de bases y la identidad de fosfatasa alcalina

Los 6 clones que muestran actividad de fosfatasa alcalina se sometieron a análisis de la secuencia de bases. Como resultado, los tamaños de los genes en los clones eran aproximadamente 2,2-5,4 kb, en los que 2 de los 6 clones eran idénticos y los clones de aproximadamente 3 kb clones contenían la longitud completa del gen mayor de 5.428 pb. El clon más grande se sometió a secuenciación (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y, como resultado, muestra una gran identidad con secuencias de aproximadamente 5 kb que incluyen pirofosfatasa de nucleótido en el genoma de *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 y mostraba una identidad (= 1455/1835 (79%)) de aproximadamente 79% con pirofosfatasa de nucleótido. Cuando se estimaba el tamaño de la pirofosfatasa, se podía observar que la fosfatasa alcalina tenía una longitud de 1.824 pb (SEQ ID N°: 2) y consistía en 607 aminoácidos (SEQ ID N°: 1). En la presente invención, la proteína se denominó "fosfatasa alcalina Pho". Además, la proteína se buscó mediante BLAST basándose en la secuencia de aminoácidos de la misma y la identidad de la misma se analizó mediante el árbol de distancias. Como resultado, la proteína mostraba gran identidad con fosfodiesterasa y fosfatasa alcalina (véase la FIG. 24).

Para referencia, *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 es una cepa de microorganismos psicrófilos (de 4 a 10°C) que están distribuidos en el mar profundo de Alaska, existen en el Mar del Norte y el Pacífico Norte en grandes cantidades y se encuentran ampliamente en tierra además de en el mar. Para que la cepa microbiana crezca en aguas profundas que carecen de nutrientes, debe ser capaz de absorber eficazmente concentraciones finas de nutrientes. Con este propósito, *Sphingopyxis alaskensis* tiene un tamaño corporal fino (0,1 μm^3 o menos) que tiene una superficie específica grande por volumen, tiene alta afinidad para micronutrientes y puede usar diversos nutrientes. Así, la cepa está recibiendo atención en biología celular.

Ejemplo 13: Análisis de las propiedades enzimáticas de una nueva fosfatasa alcalina

Se examinaron el pH y la temperatura óptimos, la estabilidad térmica y la especificidad para el sustrato de la fosfatasa alcalina seleccionada y el efecto de la misma sobre iones metálicos. Una reacción enzimática se realizó del siguiente modo. La reacción enzimática se realizó usando una mezcla de 50 mM de dietanolamina, tampón de DEA (pH 9,0), 0,5 mM de fosfato de para-nitrofenilo (pNPP) y la enzima a 37°C durante 5 minutos. La misma cantidad de NaOH 1 M se añadió para detener la reacción enzimática y se midió la cantidad de nitrofenol producida mediante la reacción enzimática. La medida se realizó al medir la absorbancia a 405 nm usando un lector de placas de fluorescencia (Victor5, Perkin-Elmer, EE. UU. de A.). 1 unidad se definió como la cantidad de enzima que puede producir 1 μmol de para-nitrofenol por minuto a 37°C.

(1) Examen de las propiedades a diversos pH y temperaturas

A fin de examinar el pH óptimo de la nueva fosfatasa alcalina, se compararon las actividades de la misma a un pH de 7,0 a 10,5. A un pH de 7,0 a 8,5, se usó tampón de Tris-HCl 50 mM y a un pH de 7,5 a 10,5, se usó tampón de DEA 50 mM. Como resultado, la fosfatasa alcalina mostraba la actividad más alta a un pH de 9,0 (véase la FIG. 25A).

Además, se compararon las actividades de la enzima a diversas temperaturas. Como resultado, la enzima mostraba la actividad óptima a 35°C (véase la FIG. 25B). Además, a fin de examinar la inactivación térmica de la enzima, la enzima se dejó reposar a diversas temperaturas durante 15 minutos y a continuación se midió la actividad enzimática restante. Como resultado, la actividad de la enzima disminuía rápidamente a medida que se incrementaba la temperatura y, a 65°C, solo quedaba una actividad enzimática de aproximadamente 3% o menos. Sin embargo, la fosfatasa alcalina (BAP) de *E. coli* tenía una gran estabilidad térmica, de modo que la actividad de la misma no se inactivaba a 800 o menos (véase la FIG. 25C).

Aplicabilidad industrial

5 Según se describe anteriormente, cuando se usa el método de la invención para cribar y cuantificar una actividad enzimática buscada, genes útiles se pueden cribar de diversas comunidades genéticas, incluyendo bibliotecas ambientales o metagenómicas. Por otra parte, se puede controlar la sensibilidad del circuito genético a derivados de fenol y la expresión del mismo y así el circuito genético puede identificar y cuantificar rápidamente diversas actividades enzimáticas. Así, la invención se puede usar ventajosamente en la tecnología de manipulación de proteínas para la modificación de enzimas. Particularmente, puede investigar cuantitativamente la actividad enzimática y así se puede aplicar a la tecnología de la evolución molecular.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Korea Research Institute of Bioscience y Biotechnology

<120> Método para detectar y cuantificar una actividad enzimática variable usando circuitería genética artificial

5 <130> PP-B0932

<150> KR10-2009-0050596

< 151> 2009-06-08

<150> KR10-2009-0130204

< 151> 2009-12-23

10 <160> 21

<170> KopatentIn 1,71

<210> 1

< 211> 27

< 212> ADN

15 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 1

ccggaattcg agctgatcga aagtcgg 27

20 <210> 2

< 211> 27

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

25 < 223> cebador

<400> 2

ccggaattcc tagccttcga tgccgat 27

<210> 3

< 211> 80

ES 2 608 691 T3

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador

5 <400> 3

gcacagctgt tgcactttgt cctgcgcaat ccgccaacct ggagaaggag atatacatat 60

ggtgagcaag ggcgaggagc 80

<210> 4

< 211> 71

< 212> ADN

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 4

gatttaatct gtatcaggct gaaaatcttc totcatccgc caaaacagaa gcttacttgt 60

acagcttgtc c 71

15 <210> 5

< 211> 48

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

20 < 223> cebador

<400> 5

atggacaagc tgtacaagta agcttctgtt ttggcggatg agagaaga 48

<210> 6

< 211> 72

25 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 608 691 T3

< 223> cebador
<400> 6
agcggataac aatttcacac agaaacagct atgaccatga ttacgccaag agtttgtaga 60
aacgcaaaaa gg 72
<210> 7
5 < 211> 46
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> cebador
10 <400> 7
tctctcatcc gccaaaacag gaattcctag ccttcgatgc cgattt 46
<210> 8
< 211> 48
< 212> ADN
15 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> cebador
<400> 8
tcttctctca tccgcaaaaa cagaagctta ctgtacagc ttgtccat 48
20 <210> 9
< 211> 29
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
25 < 223> cebador
<400> 9
cccgaattct tcttcgtctg ttctactg 29
<210> 10

ES 2 608 691 T3

< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
5 < 223> cebador
<400> 10
cccgaattca atggcgatga cgcacacctca 30
<210> 11
< 211> 70
10 < 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> cebador
<400> 11
cggataacaa ttccacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaage ttatttgtag 60
agctcatcca 70
15
<210> 12
< 211> 70
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
20 <220>
< 223> cebador
<400> 12
acctggagat ggccgtgacc aataccecca caccgacttt cgatcagctc atgagtaaag 60
gagaagaact 70
<210> 13
25 < 211> 70
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

ES 2 608 691 T3

<220>
 < 223> cebador
 <400> 13
acctggagat ggccgtgacc aataccccca caccgacttt cgatcagctc atggagaaa 60
 5
aatcactgg 70
 <210> 14
 < 211> 70
 < 212> ADN
 10 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 14
cggataacaa ttccacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttacgccccg 60
ccctgccact 70
 15 <210> 15
 < 211> 70
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 < 223> cebador
 <400> 15
acctggagat ggccgtgacc aataccccca caccgacttt cgatcagctc atgaaatcta 60
acaatgcgct 70
 <210> 16
 < 211> 70
 25 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 608 691 T3

< 223> cebador
<400> 16
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tcaggtcgag 60
gtggcccggc 70
<210> 17
5 < 211> 70
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> cebador
10 <400> 17
acctggagat ggccgtgacc aataccccca caccgacttt cgatcagctc atgagccata 60
ttcaacggga 70
<210> 18
< 211> 70
< 212> ADN
15 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> cebador
<400> 18
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttagaaaaac 60
20 tcatcgagca 70
<210> 19
< 211> 40
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
25 <220>
< 223> cebador
<400> 19

ES 2 608 691 T3

gatcgactcc ttcgaggatga aaatctgccca gaccgacctg 40

<210> 20

< 211> 40

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador

<400> 20

caggtcggtc tggcagattt tcacctgaa ggagtcgac 40

10 <210> 21

< 211> 2157

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> fragmento de ADN que consiste en el gen dmpR que incluye EcoRI, operador-promotor de dmp, secuencia parcial del gen dmpK y secuencia de enzima de restricción

<400> 21

ccggaattcg agctgatcga aagtcgggtg gggggattg gtcacggcca tctccaggtt	60
ggcggattgc gcaggacaaa gtgcaacagc tgtgccaaagg tctgaaaacc gacttcaagg	120
tattgttttt caatgtgttt ctaattttta gaatgatcgg agcgagcgaa attaagccgc	180
gcttgccgag gctttttaag catttgatca attgcccagg gccgcttgag caaatgctca	240
tggegcagct gaaggetgat ctctagcact aaagtcactg ccgtegattg atcatttggt	300
tgaacttttgc cagatactga ggtcggctat ggggagctgg cgcaggtgaa aaaactgccg	360
atthtcccca tgaccccatc tggaatcgcc gcctgccttg cgctatagcg gcgacctga	420

ES 2 608 691 T3

tttccceatc taaaaataaa taggggcctc gcttacatgc cgatcaagta caagcctgaa	480
atccagcaact ccgatttcaa ggacctgacc aacctgatcc acttccagag cacggaaggc	540
aagatctggc ttggcgaaca acgcatgctg ttgctgcagg tttcagcaat ggccagcttt	600
cgccgggaaa tggtaatac cctgggcatc gaacgcgcca agggcttctt cctgcgccag	660
ggttaccagt ccggcctgaa ggatgccgaa ctggccagga agcttagacc gaatgccagc	720
gagtacgaca tgttcctcgc cggcccgcag ctgcattcgc tcaagggctt ggtcaaggtc	780
cgccccaccg aggtcgatat cgacaaggaa tgcgggcgct tctatgccga gatggagtgg	840
atcgactcct tcgaggtgga aatctgccag accgacctgg ggcagatgca agaccgggtg	900
tgctggactc tgctcggcta cgctcgcgcc tattcctcgg cgttcatggg ccgggaaatc	960
atcttcaagg aagtcagctg ccgcggtcgc ggcggcgaca agtgccgggt cattggcaag	1020
ccggccgaag agtgggacga cgttgccagc ttcaaacagt atttcaagaa cgaccccatc	1080
atcgaggaac tctacgagtt gcaatcgcaa ctgggtgcgc tgcgtaccaa cctcgacaaa	1140
caggaaggcc agtactacgg catcgggtcag accccggcct accagaccgt gcgcaatatg	1200
atggacaagg ccgcacaggg caaagtctcg gtgctgctgc ttggcgagac cggggctcggc	1260
aaggaggtca tcgcgcgtag cgtgcacctg cgcagcaaac gcgcccgcga gccctttgtc	1320
gcggtgaact gtgcggcgat cccgccggac ctgatcgagt ccgaattgtt cggcgtgaa	1380
aaaggcgctt tcaccggcgc caccagctca cgcattggcc gcttcgagcg ggccgacaag	1440
ggcaccatct tccttgacga ggtgatcgaa ctcagcccgc gcgctcaggc cagtttctgt	1500
cgcgtgctgc aagaaggcga gctggagcga gttggcgaca accgcacgcg caagatcgac	1560
gtaagggtta tcgcagccac ccacgaggac ctggccgaag cggtaaggc cgggcgtttt	1620
cgcgccgacc tgtactaccg gctgaacgtt ttcccgtgg cgatcccggc gttgcgcgaa	1680
cgccgcgagg acattccact gctggttgag cacttccttc agcgttcca ccaggagtac	1740
ggcaagagaa ccctcggcct ttcagacaaa gccctggagg cctgcctgca ttacagttgg	1800
ccgggcaata tccgtgagct ggagaacgtc atcgagcgcg gcatcatcct caccgatccg	1860
aacgaaagca tcagcgtgca ggcgctgttc ccacggcgcg cggaaagacc gcagaccgcc	1920
agcgagcggg tgcgctcgga cggcgtgctg attcagccag gcaatggcca gggcagttgg	1980
atcagccagt tgttgagcag cggcctgagc ctcgacgaga tcgaggaaag cctgatgcgc	2040
aaagccatgc aacaggccaa ccaaaacgtc tccggtgccg cgcgcttctt cggcctaagc	2100
cgaccggcac tggcctatcg gctgaagaaa atcggcatcg aaggctagga attccgg	2157

REIVINDICACIONES

1. Un método para cribar una actividad enzimática buscada para la producción de un compuesto fenólico usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

5 (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos, (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS (sitio de unión ribosómica) para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

10 en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo;

(b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

15 (c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

20 (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida por la proteína reguladora que identifica el compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica.

2. Un método para cribar una actividad enzimática buscada para la producción de un compuesto fenólico usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

30 en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo;

(b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

35 (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito genético artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

40 (e) detectar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida por la proteína reguladora que identifica el compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora.

3. Un método para cuantificar una actividad enzimática buscada para la producción de un compuesto fenólico usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

5 (a) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

10 en donde proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

(c) introducir la clonoteca o genoteca y el circuito génico artificial para detectar el compuesto fenólico en microorganismos hospedadores para preparar microorganismos recombinantes;

15 (d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; y

(e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora.

4. Un método para cuantificar una actividad enzimática buscada para la producción de un compuesto fenólico usando un circuito genético artificial, comprendiendo el método las etapas de:

20 (a) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

25 en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo; (b) proporcionar una clonoteca o genoteca que contiene un gen que codifica la enzima que se va a cribar;

30 (c) introducir la clonoteca o genoteca en microorganismos que contienen el circuito génico artificial para detectar el compuesto fenólico para preparar microorganismos recombinantes;

(d) tratar los microorganismos recombinantes con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar; and

35 (e) cuantificar la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora.

5. Un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de la enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar a biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural;

40 (b) proporcionar un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

45

en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo;

5 (c) introducir la biblioteca metagenómica y el circuito genético artificial en microorganismos hospedadores para construir una biblioteca de microorganismos transformados;

(d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar;

10 (e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y

(f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

15 6. Un método para cribar una enzima buscada capaz de liberar un compuesto fenólico mediante la reacción de la enzima procedente de una biblioteca metagenómica, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar a biblioteca metagenómica a partir de un ambiente natural;

20 (b) proporcionar microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma un circuito genético artificial para detectar un compuesto fenólico, comprendiendo el circuito genético artificial (i) un gen que codifica una proteína reguladora, (ii) al menos un gen indicador seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican proteínas fluorescentes y genes de resistencia a antibióticos y (iii) una región reguladora de la expresión génica que consiste en un promotor que regula la expresión de la proteína reguladora, una región a la que se une la proteína reguladora para inducir la expresión de un gen indicador aguas abajo y un promotor que regula la expresión del gen indicador y (iv) un RBS para facilitar la expresión del gen indicador y un terminador de la transcripción,

25 en donde la proteína reguladora de (i) reconoce un compuesto fenólico para inducir la unión de la proteína reguladora a la región reguladora de la expresión génica y activar un promotor del gen indicador de modo que se pueda expresar el gen indicador aguas abajo; (c) introducir la biblioteca metagenómica en los microorganismos que contienen en su ADN cromosómico o citoplasma el circuito genético artificial para construir una biblioteca de microorganismos transformados;

30 (d) tratar la biblioteca de microorganismos transformados con un compuesto de descarga de fenol capaz de liberar un compuesto fenólico mediante una reacción enzimática de la enzima buscada que se va a cribar;

(e) medir la actividad de la proteína indicadora cuya expresión era inducida mediante la identificación del compuesto fenólico liberado por la reacción enzimática y la unión de la proteína reguladora a la región reguladora, realizando de ese modo el cribado de alto rendimiento de microorganismos que tienen actividad de liberación del compuesto fenólico mediante la reacción enzimática; y

35 (f) recoger un gen de la enzima, que es capaz de liberar el compuesto fenólico mediante la reacción enzimática, a partir de los microorganismos cribados y a continuación identificar el gen mediante secuenciación.

40 7. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en α -glucosidasa, β -glucosidasa, celulasa, glucosilceramidasa, fosfatasa, fitasa, esterasa, lipasa, uretanasas, amidasa, peptidasa, proteinasa, oxidorreductasa, fenol-liasa, dihalogenasa, isomerasa, monooxigenasa y dioxigenasa.

45 8. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto fenólico es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-clorofenol, m-clorofenol, p-clorofenol, o-nitrofenol, m-nitrofenol, p-nitrofenol, ácido salicílico, 2-aminofenol, 2-metoxifenol, catecol, resorcinol, 3-metilcatecol, 2,4-dimetilfenol, 2,5-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, 2,3-dimetilfenol, 3,5-dimetilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,5-diclorofenol, 2,3-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 3,4-diclorofenol, 3,5-diclorofenol, 2,4-dinitrofenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 2-etilfenol, 3-etilfenol, 2-fluorofenol, 2-yodofenol y benceno.

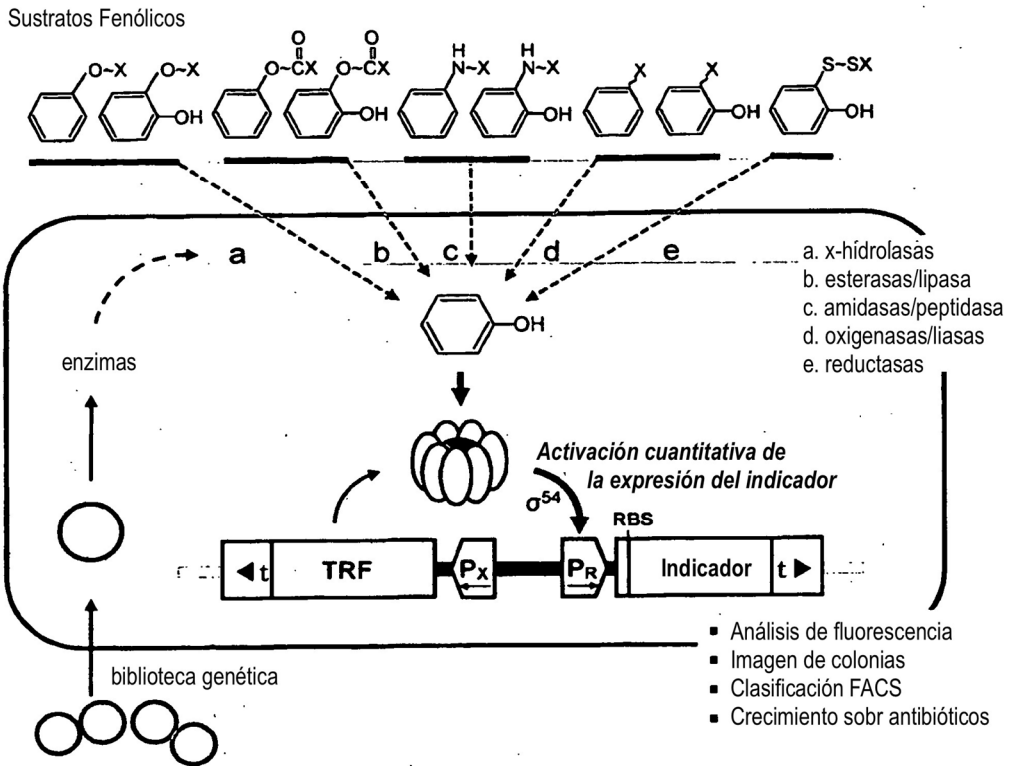
50 9. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que compuesto de descarga de fenol se selecciona del grupo que consiste en ésteres que contienen un grupo fenol; éteres que contienen un

grupo fenol; glucósidos que contienen un grupo fenol; fosfoésteres que contienen un grupo fenol; derivados de fenol que contienen un grupo alquilo, hidroxilo, carboxilo, amino, tiol, amida, sulfuro o halógeno en las posición *orto*, *meta* o *para*; y compuestos de anillo bencénico.

- 5 10. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que la proteína reguladora que reconoce un compuesto fenólico es DmpR o su variante.
11. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, una levadura, una célula vegetal o una célula animal.
- 10 12. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia de RBS de *E. coli* se inserta en el circuito genético artificial para facilitar la expresión del gen indicador en *E. coli*.
- 15 13. El método según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 6, en el que el gen indicador es un indicador doble que consiste tanto en una proteína de fluorescencia como en un gen de resistencia a antibiótico.
14. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que el circuito genético contiene además un gen suicida.
- 20 15. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que el tratamiento del compuesto de descarga de fenol se realiza cuando el valor del crecimiento celular (OD₆₀₀/ml) de los microorganismos transformados alcanzaba aproximadamente 1,5-4.
- 25 16. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que la reacción enzimática se realiza durante 14~16 horas después del tratamiento del compuesto de descarga de fenol.
- 30 17. El método según la reivindicación 5 o 6, en el que la etapa de tratamiento con el compuesto de descarga de fenol consiste en las etapas of: (i) recoger un microorganismo desarrollado en un medio nutritivo; y (ii) tratar el microorganismo recogido con el compuesto de descarga de fenol en medio mínimo.

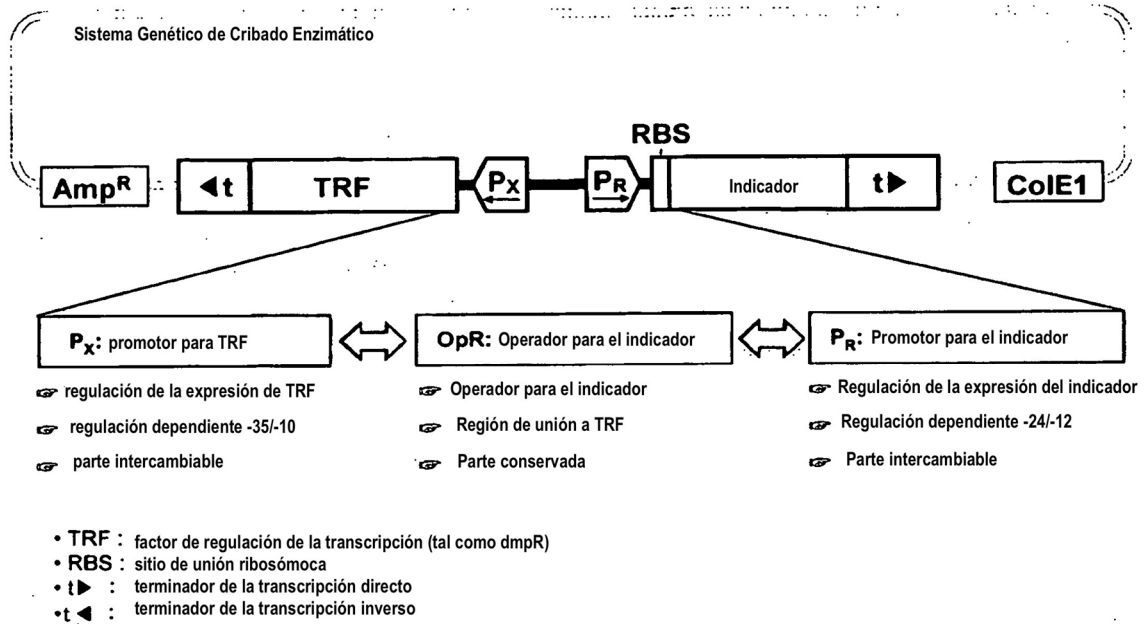
[FIG 1]

(A)



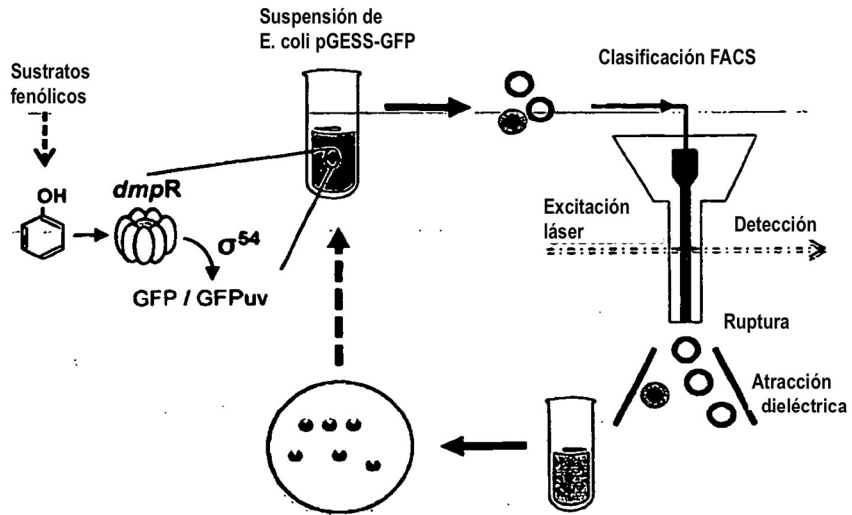
[FIG 1]

(B)

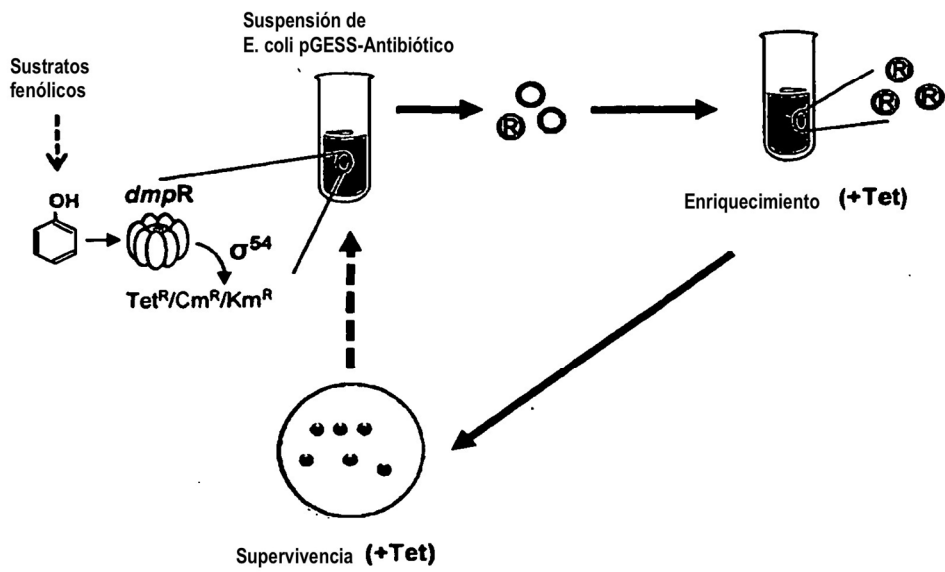


[FIG 2]

(A)

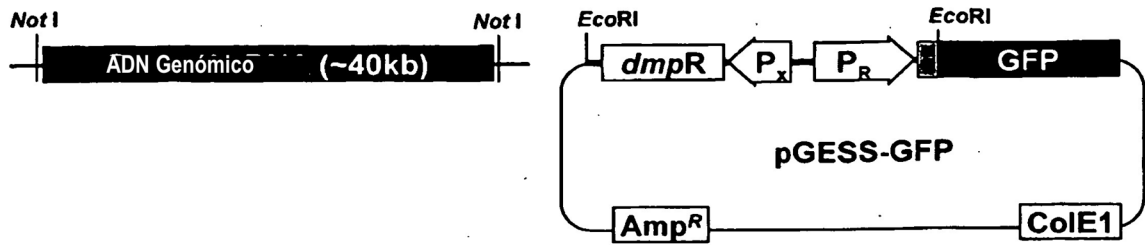


(B)

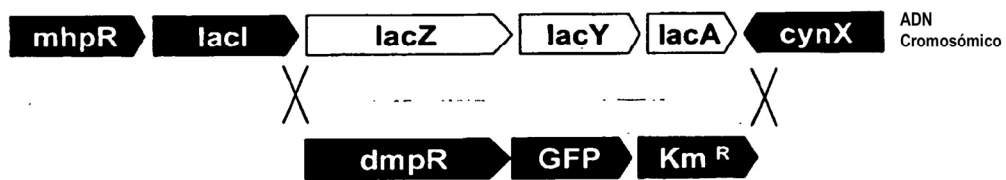


[FIG 3]

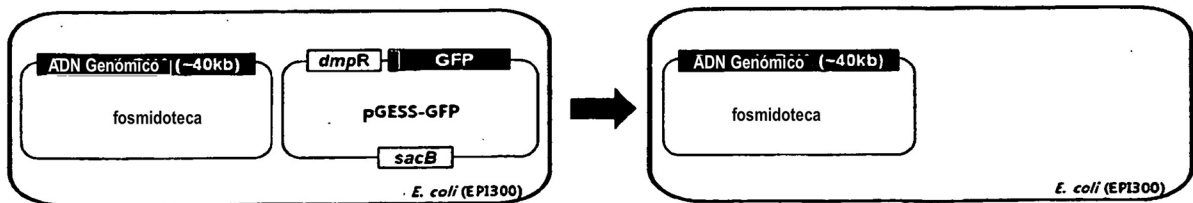
(A)



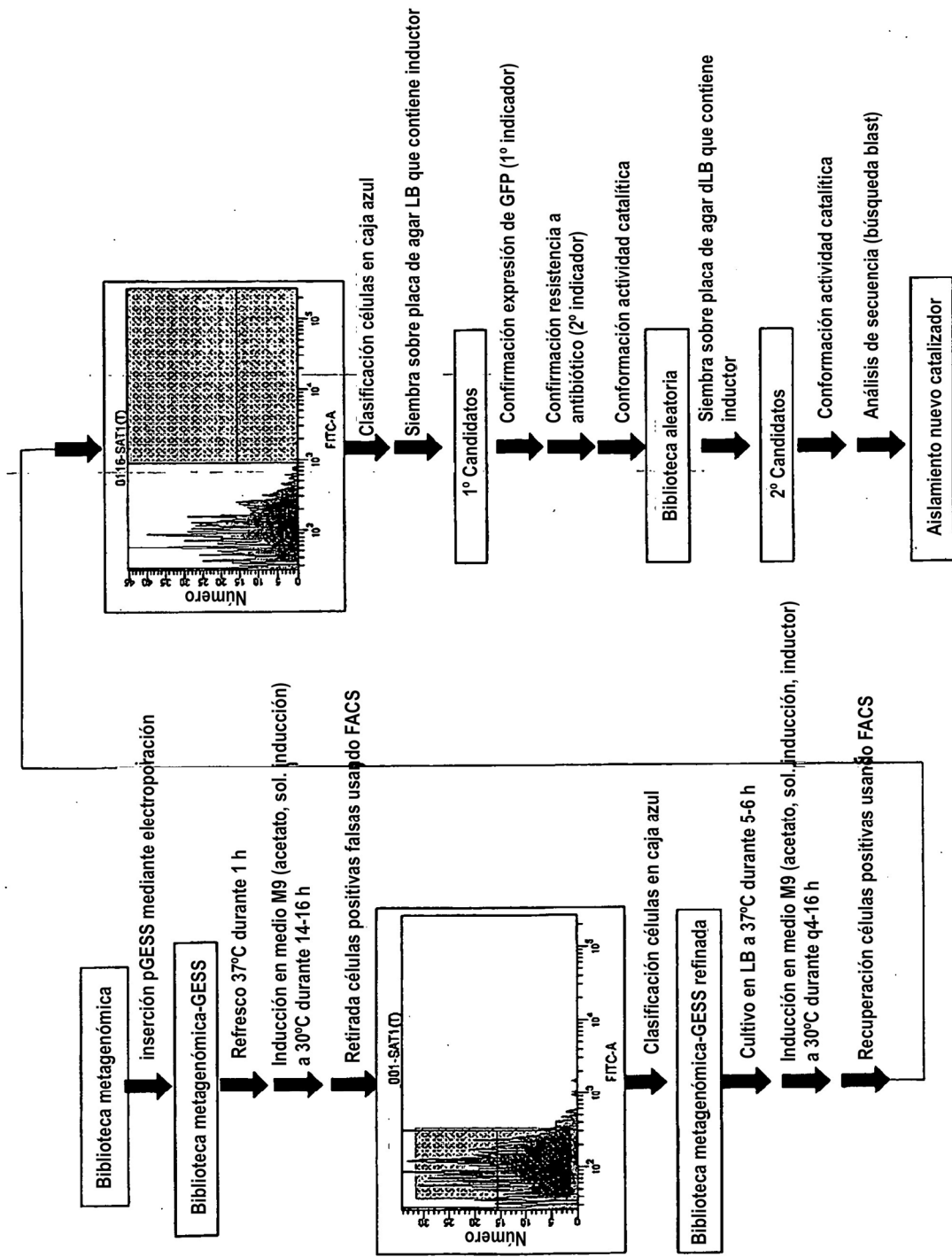
(B)



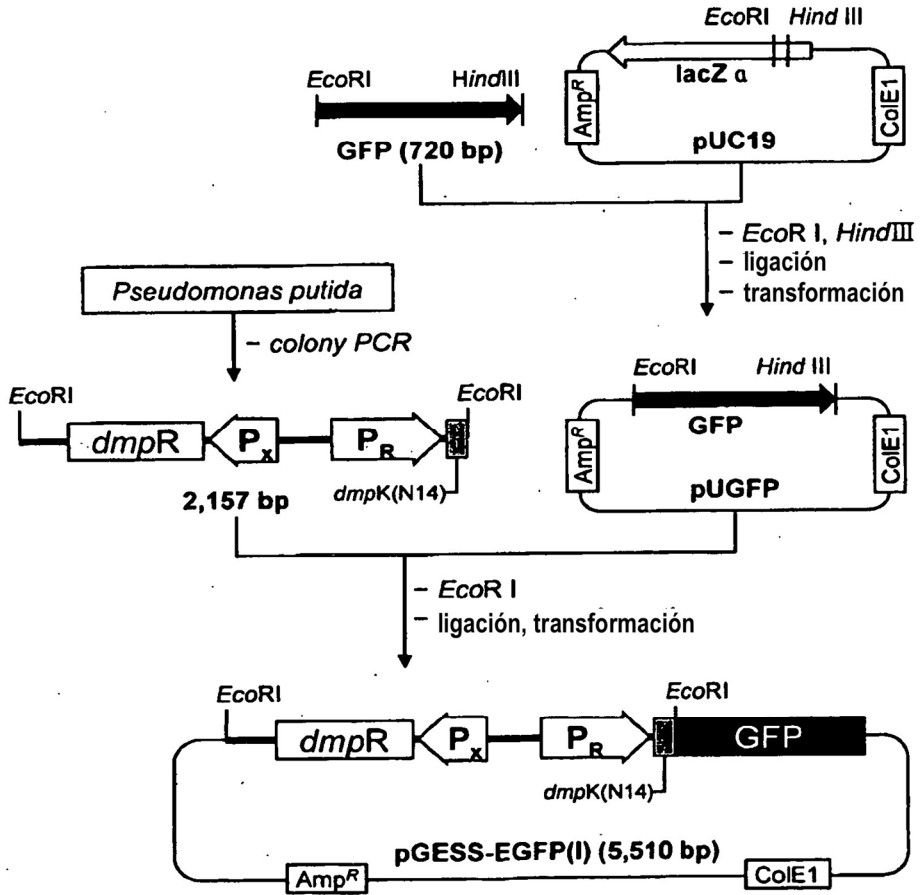
(C)



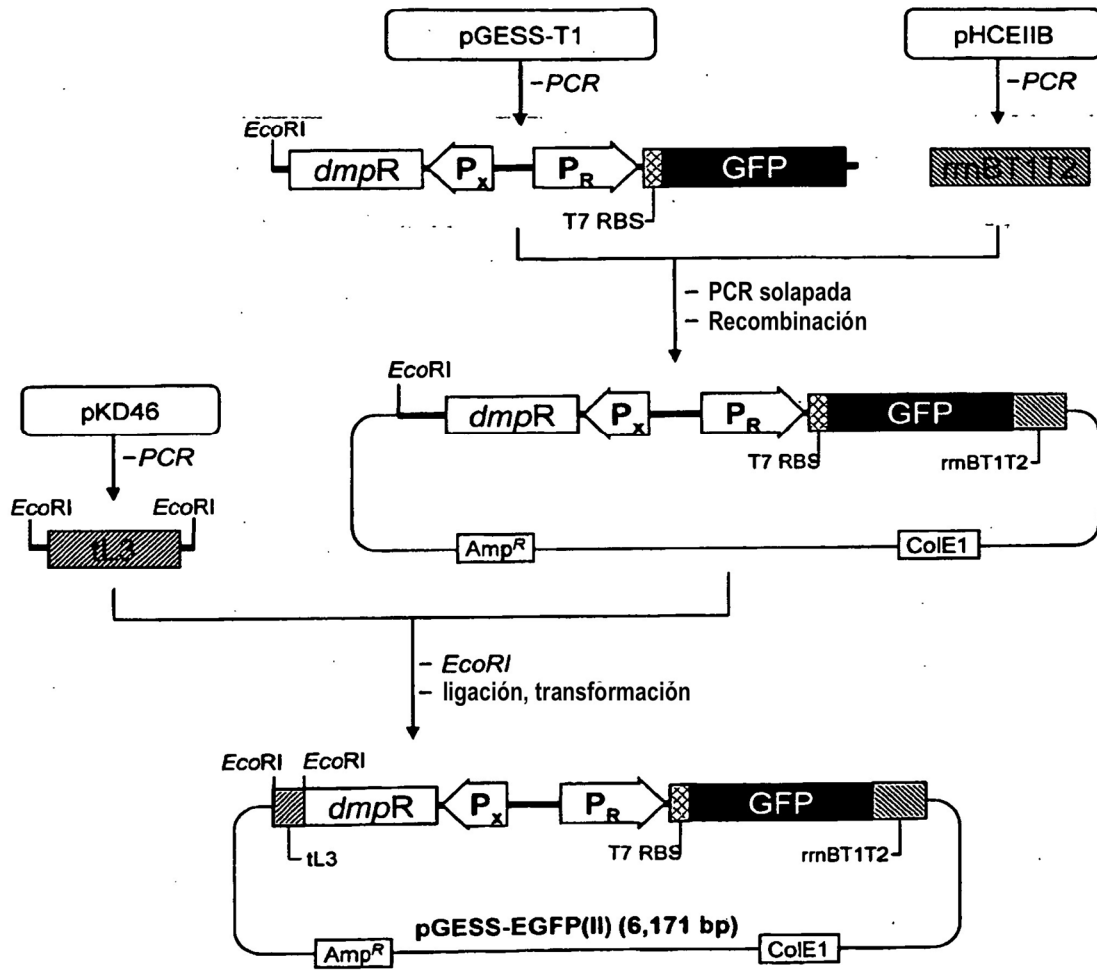
[FIG 4]



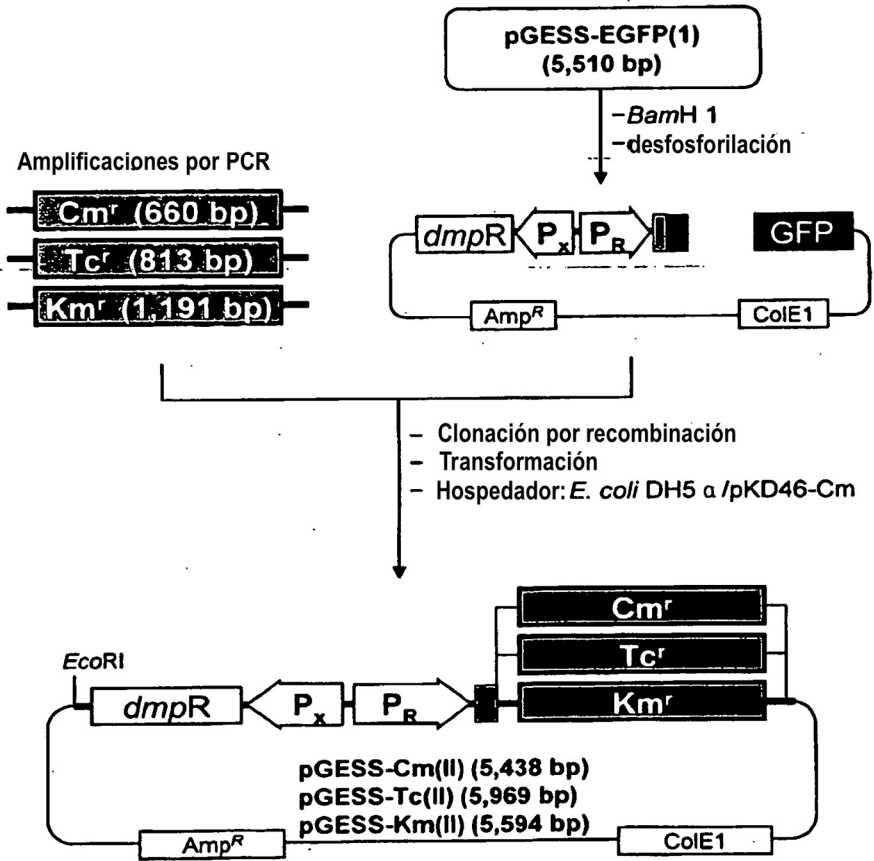
[FIG 5]



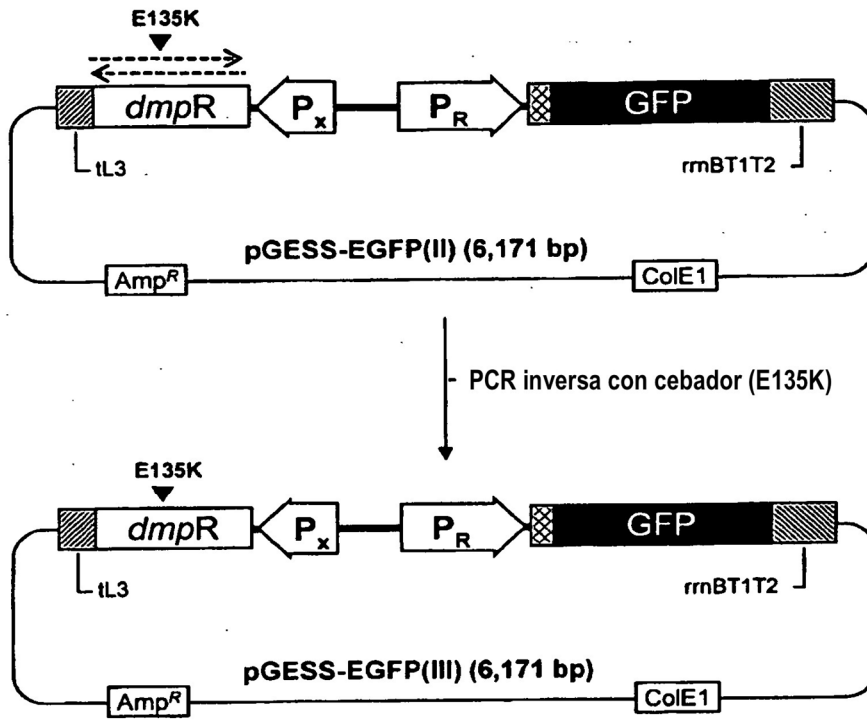
[FIG 6]



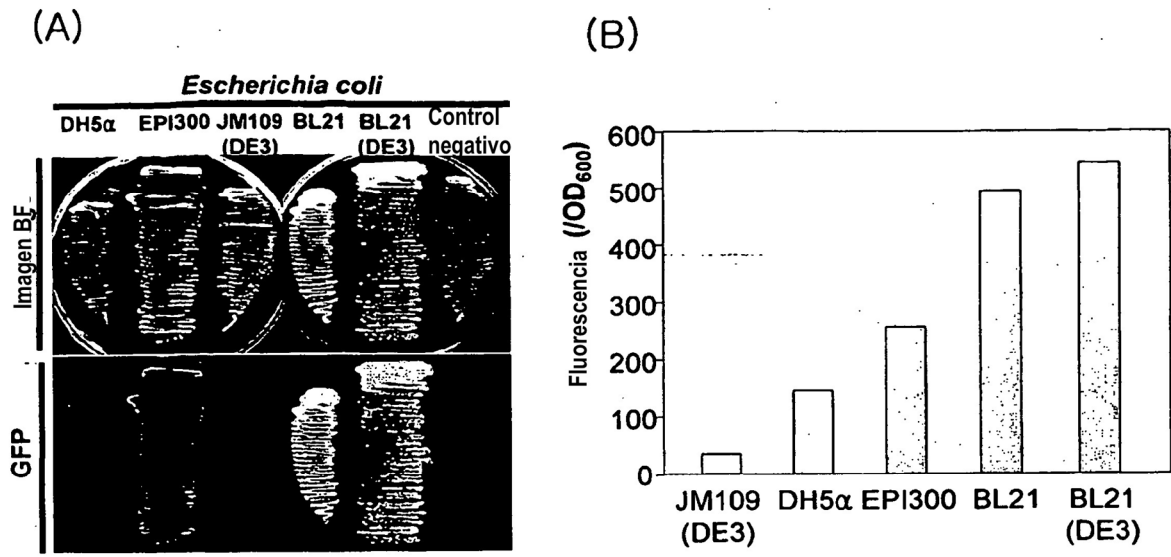
[FIG 7]



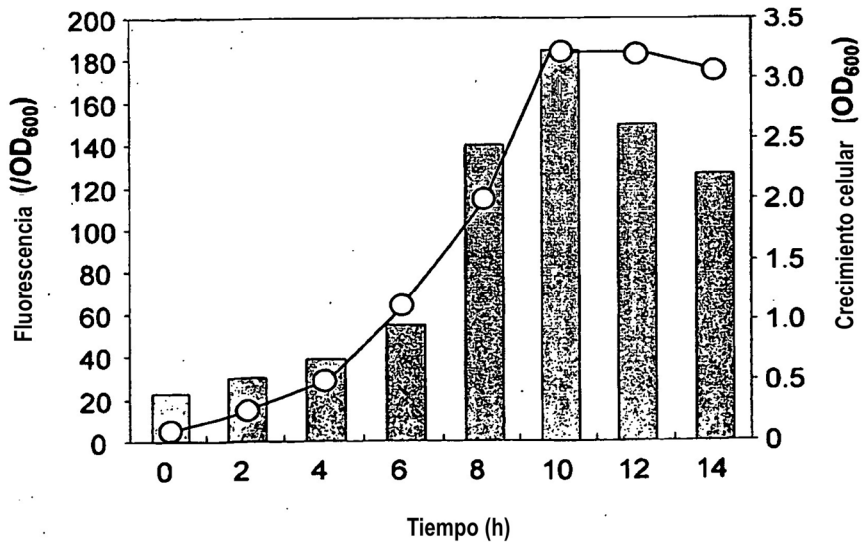
[FIG 8]



[FIG 9]

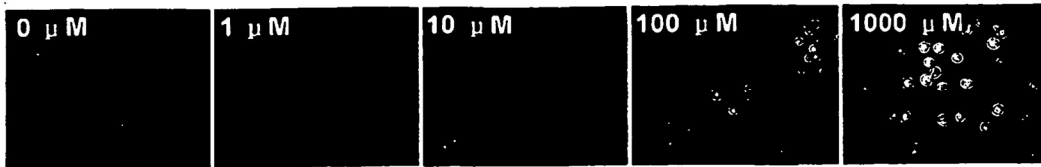


(C)

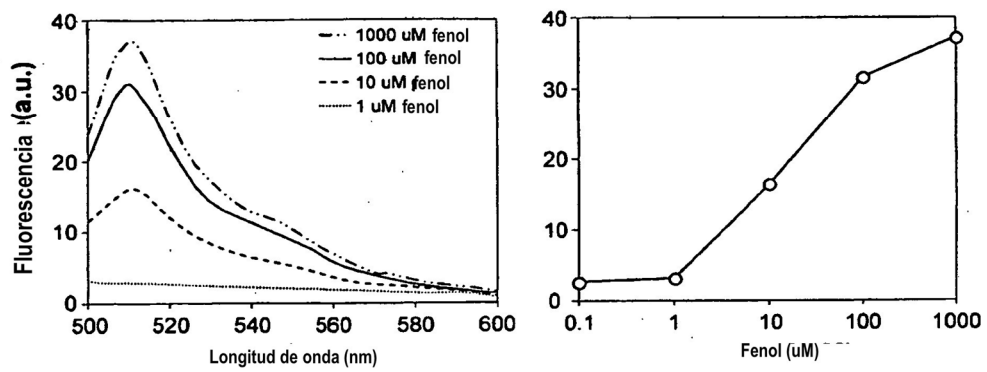


[FIG 10]

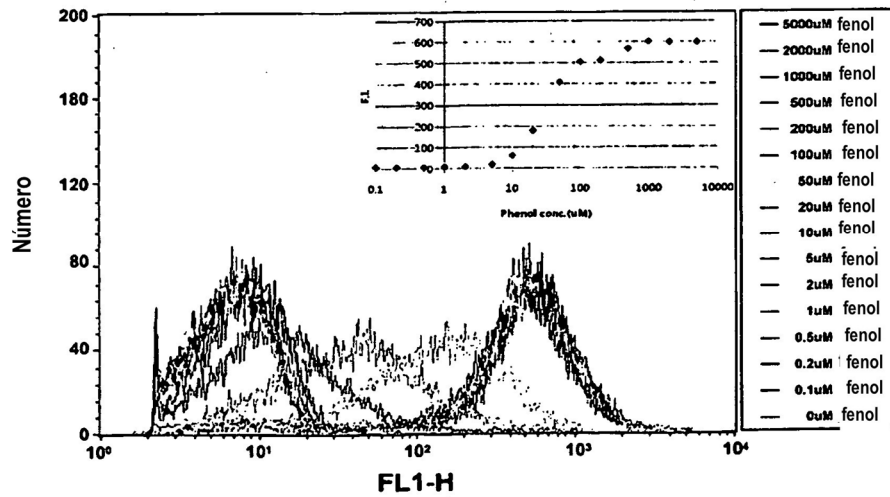
(A)



(B)

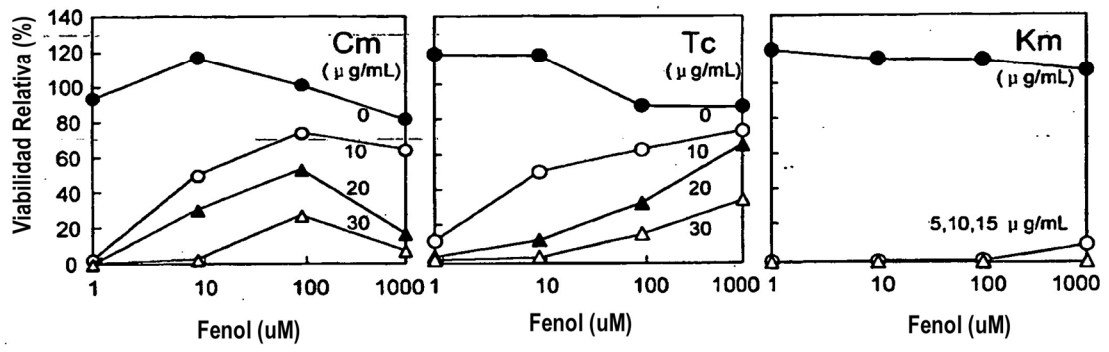


(C)

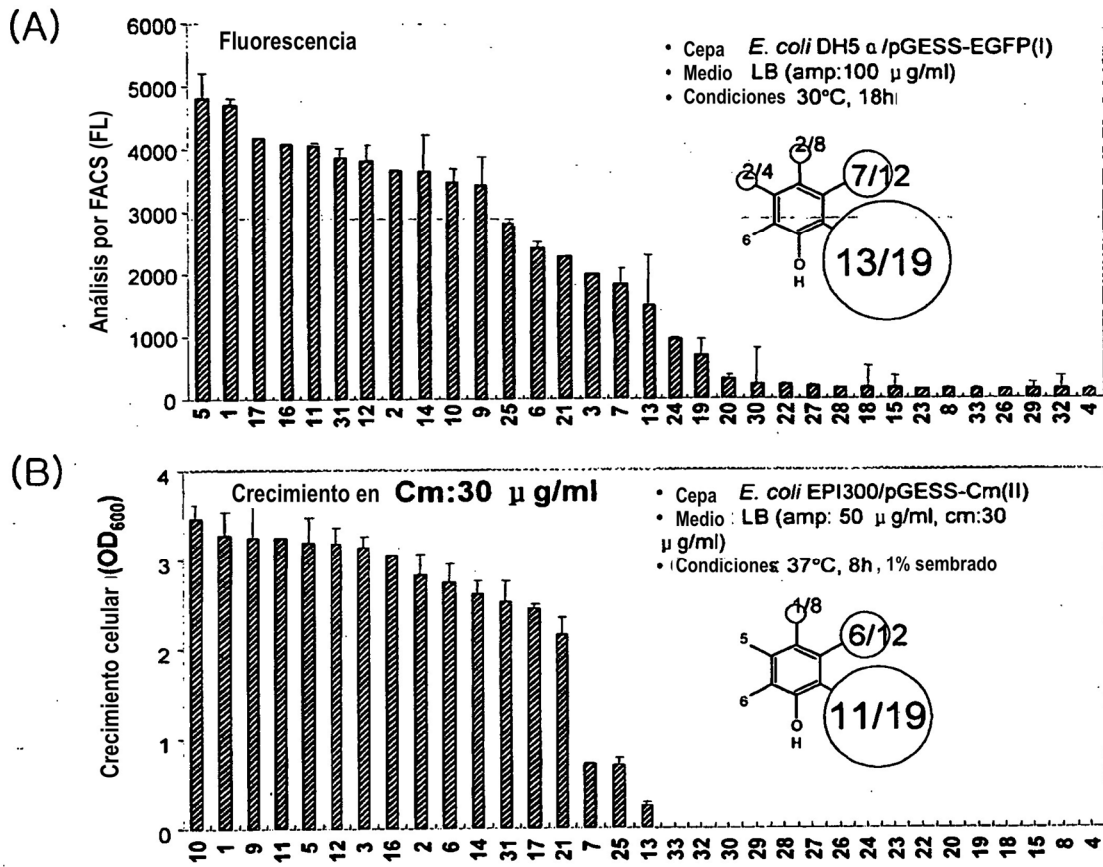


[FIG 10]

(D)



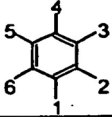
[FIG 11]



1 fenol	12 m-cresol	23 2,4-diclorofenol
2 o-nitrofenol	13 p-cresol	24 2,5-diclorofenol
3 m-nitrofenol	14 catecol	25 2,3-diclorofenol
4 o-nitrofenol	15 resorcinol	26 2,6-diclorofenol
5 o-clorofenol	16 2-fluorofenol	27 3,4-diclorofenol
6 m-clorofenol	17 2-yodofenol	28 3,5-diclorofenol
7 p-clorofenol	18 2,4-dimetilfenol	29 2,4-dinitrofenol
8 ácido salicílico	19 2,5-dimetilfenol	30 3-metilcatecol
9 2-aminofenol	20 3,4-dimetilfenol	31 2-etilfenol
10 2-metoxifenol	21 2,3-dimetilfenol	32 3-etilfenol
11 o-cresol	22 3,5-dimetilfenol	33 benceno

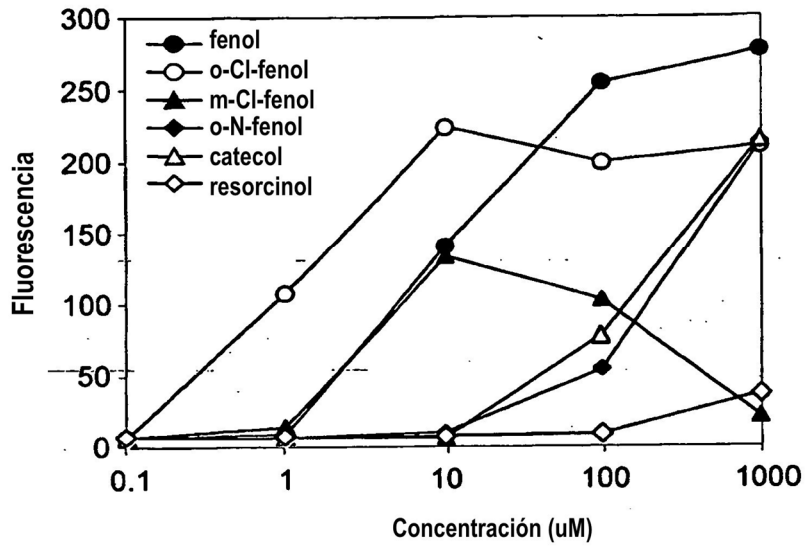
[FIG 11]

(C)

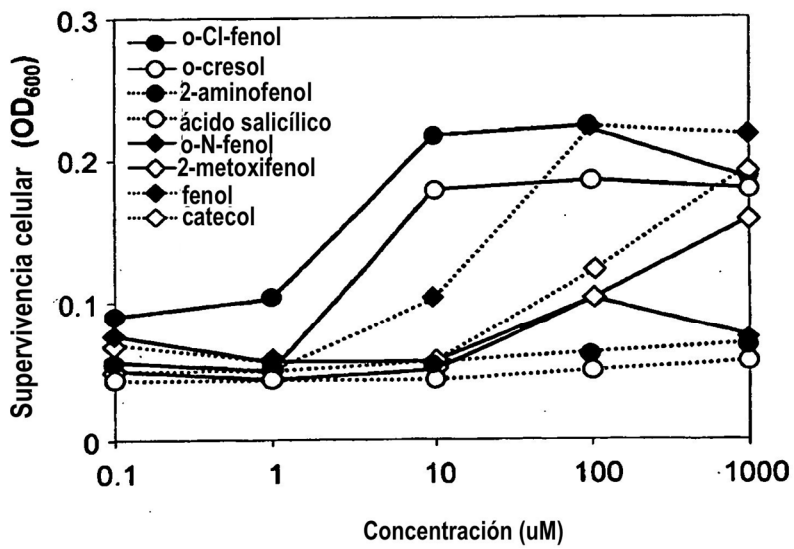
Nº		Cadenas laterales aromáticas					
		1	2	3	4	5	6
1	fenol	OH
2	o-nitrofenol	OH	NO ₂
3	m-nitrofenol	OH	.	NO ₂	.	.	.
4	p-nitrofenol	OH	.	.	NO ₂	.	.
5	o-clorofenol	OH	Cl
6	m-clorofenol	OH	.	Cl	.	.	.
7	p-clorofenol	OH	.	.	Cl	.	.
8	ácido salicílico	OH	COOH
9	2-aminofenol	OH	NH ₂
10	2-metoxifenol	OH	OCH ₃
11	o-cresol	OH	CH ₃
12	m-cresol	OH	.	CH ₃	.	.	.
13	p-cresol	OH	.	.	CH ₃	.	.
14	catecol	OH	OH
15	resorcinol	OH	.	OH	.	.	.
16	2-fluorofenol	OH	F
17	2-yodofenol	OH	I
18	2,4-dimetilfenol	OH	CH ₃	.	CH ₃	.	.
19	2,5-dimetilfenol	OH	CH ₃	.	.	CH ₃	.
20	3,4-dimetilfenol	OH	.	CH ₃	CH ₃	.	.
21	2,3-dimetilfenol	OH	CH ₃	CH ₃	.	.	.
22	3,5-dimetilfenol	OH	.	CH ₃	.	CH ₃	.
23	2,4-diclorofenol	OH	Cl	.	Cl	.	.
24	2,5-diclorofenol	OH	Cl	.	.	Cl	.
25	2,3-diclorofenol	OH	Cl	Cl	.	.	.
26	2,6-diclorofenol	OH	Cl	.	.	.	Cl
27	3,4-diclorofenol	OH	.	Cl	Cl	.	.
28	3,5-diclorofenol	OH	.	Cl	.	Cl	.
29	2,4-dinitrofenol	OH	NO ₂	.	NO ₂	.	.
30	3-metilcatecol	OH	OH	CH ₃	.	.	.
31	2-etilfenol	OH	CH ₂ CH ₃
32	3-etilfenol	OH	.	CH ₂ CH ₃	.	.	.
33	benceno

[FIG 12]

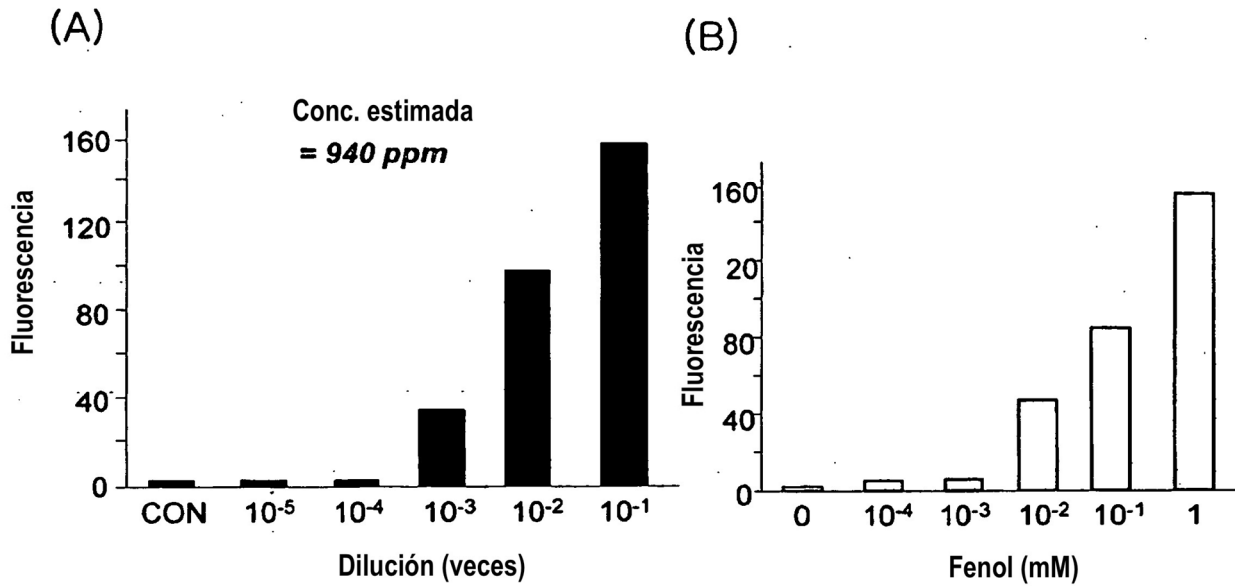
(A)



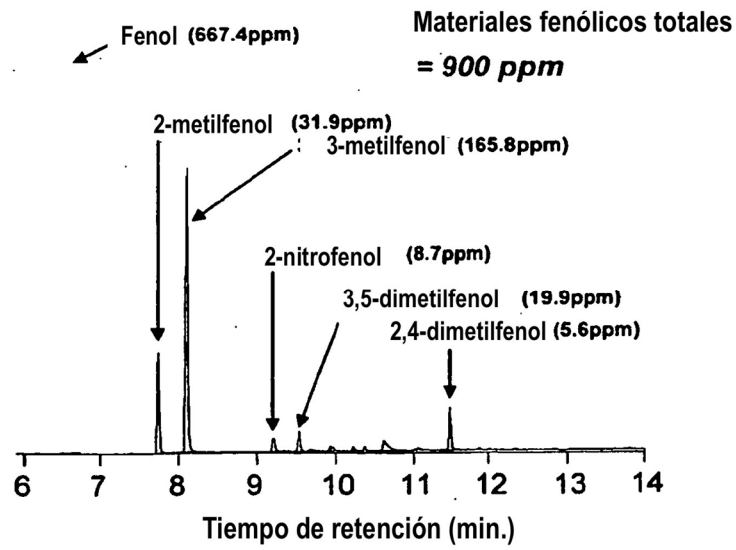
(B)



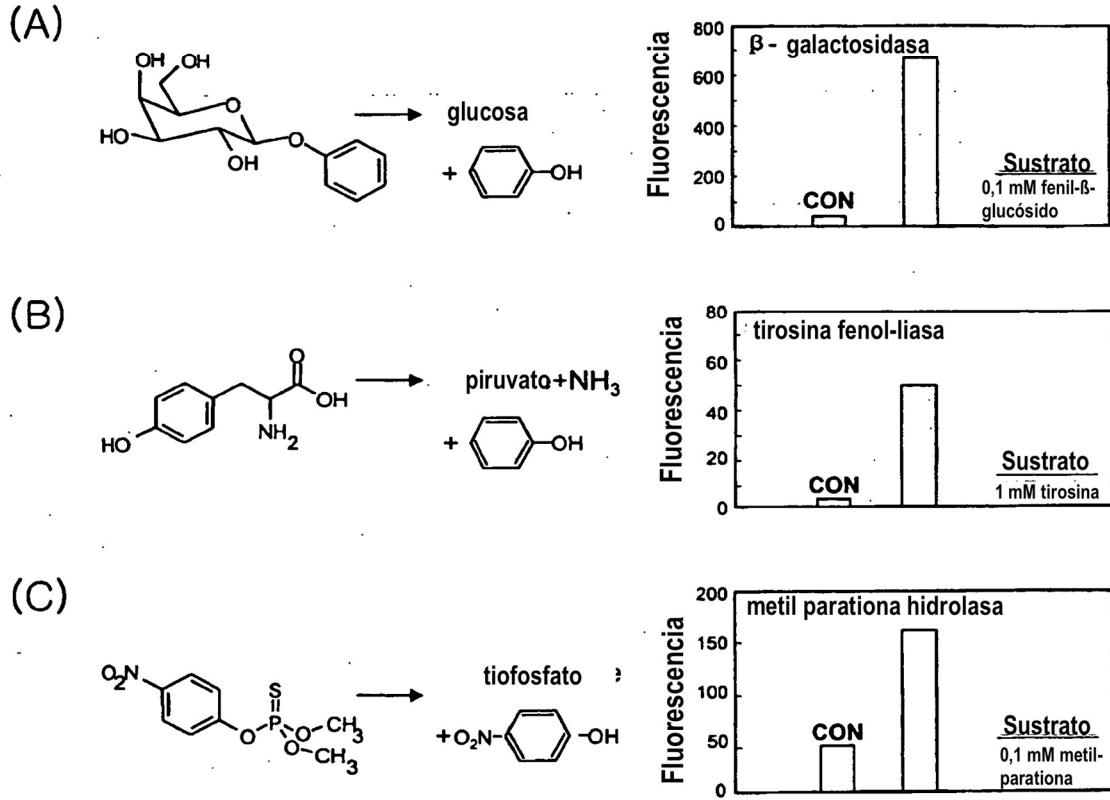
[FIG 13]



(C)

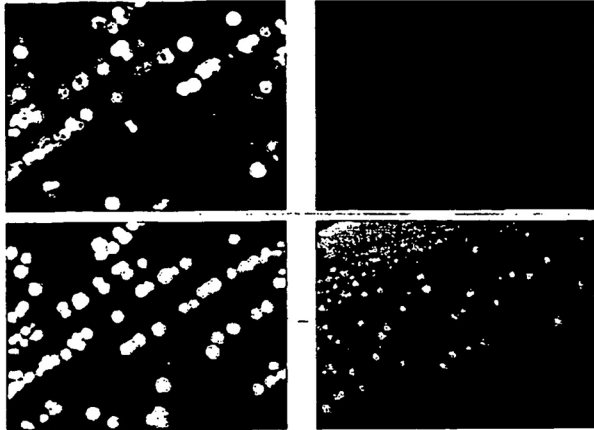


[FIG 14]

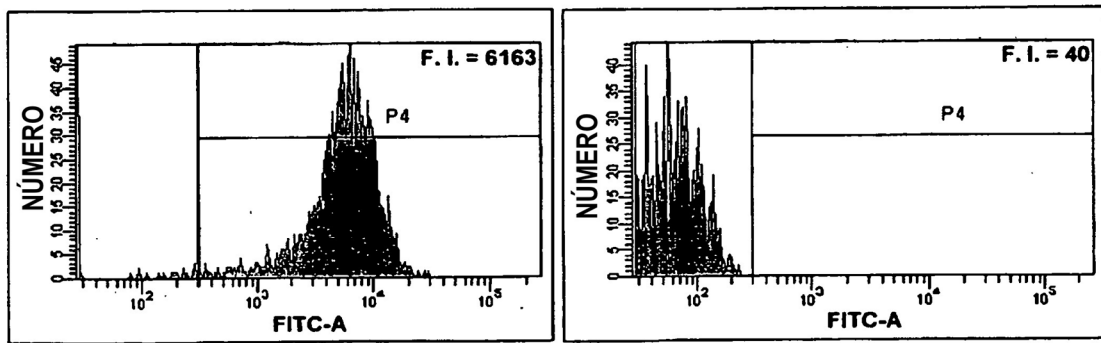


[FIG 15]

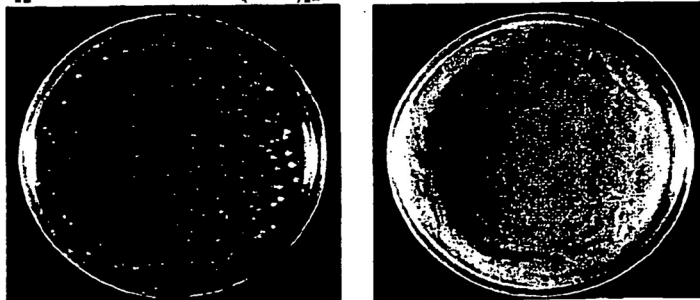
(A) Células que tienen TPL Células que no tienen TPL



(B) Células que tienen TPL Células que no tienen TPL



(C) [Medio de selección(+Tet)] [Sin medio de selección(-Tet)]

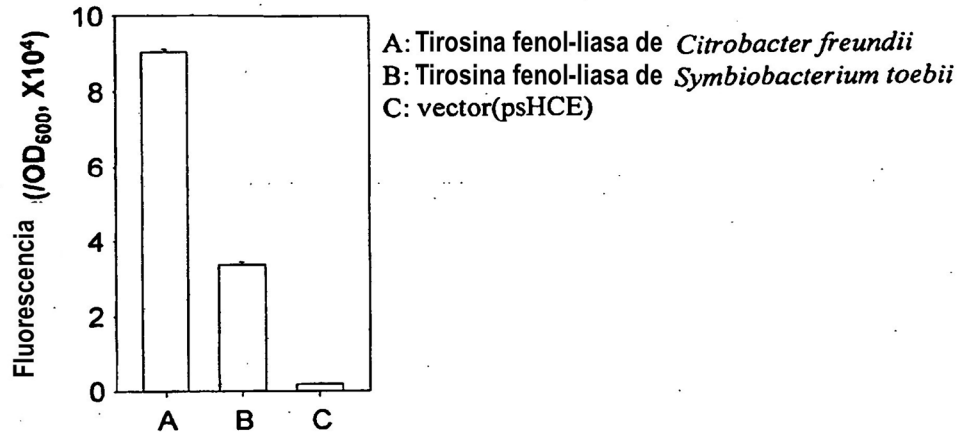


Número de células: 4×10^2

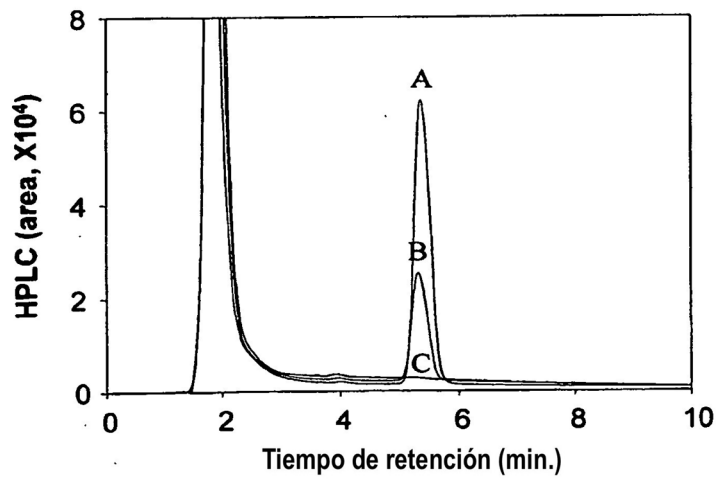
Número de células: 1.5×10^7

[FIG 16]

(A)



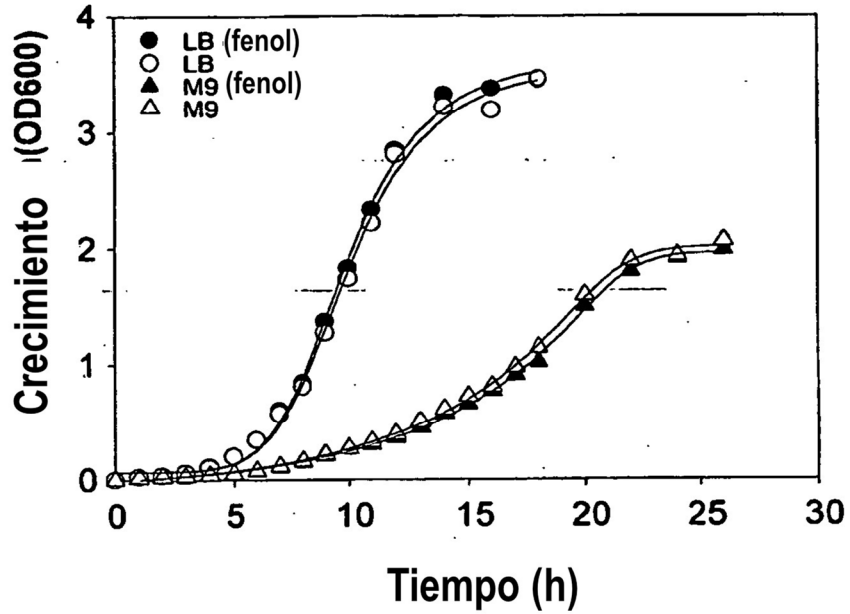
(B)



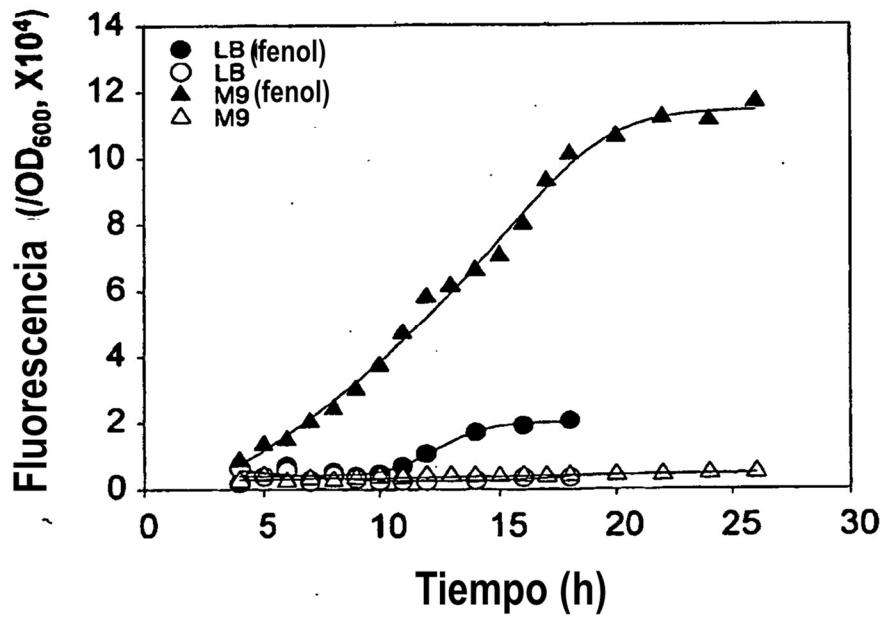
A: Tirosina fenol-liasa de *Citrobacter freundii*
 B: Tirosina fenol-liasa de *Symbiobacterium toebii*
 C: vector(psHCE)

[FIG 17]

(A)

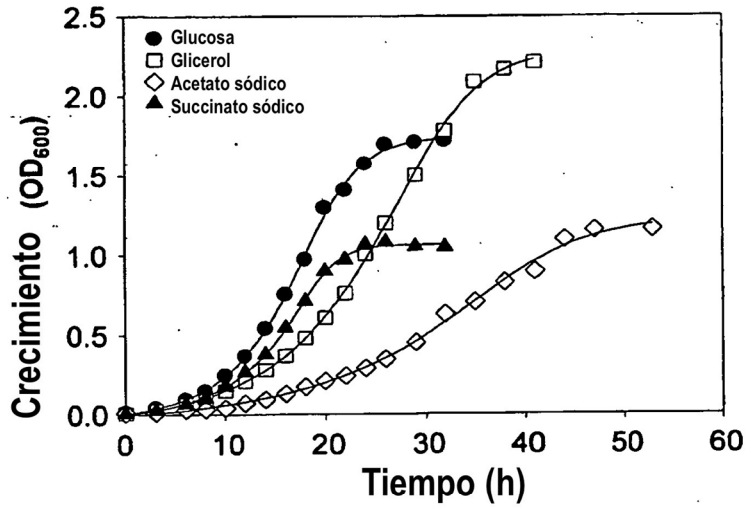


(B)

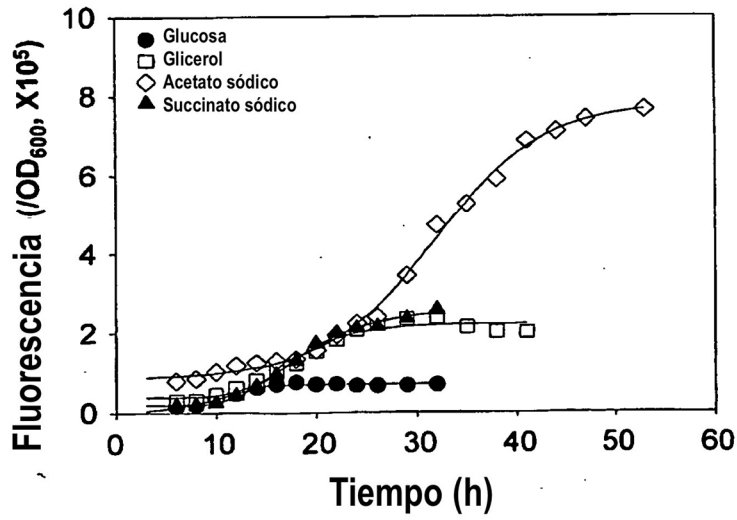


[FIG 18]

(A)

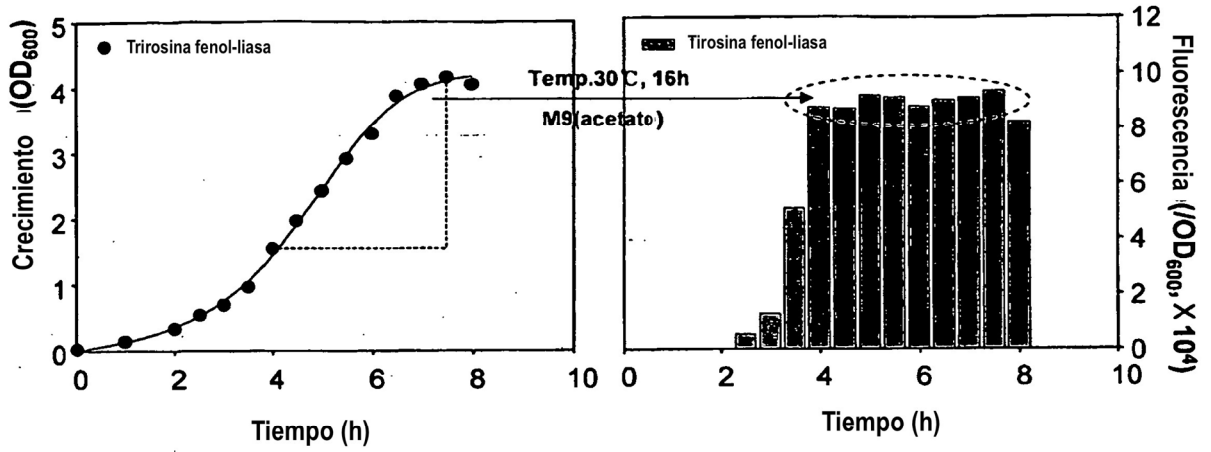


(B)

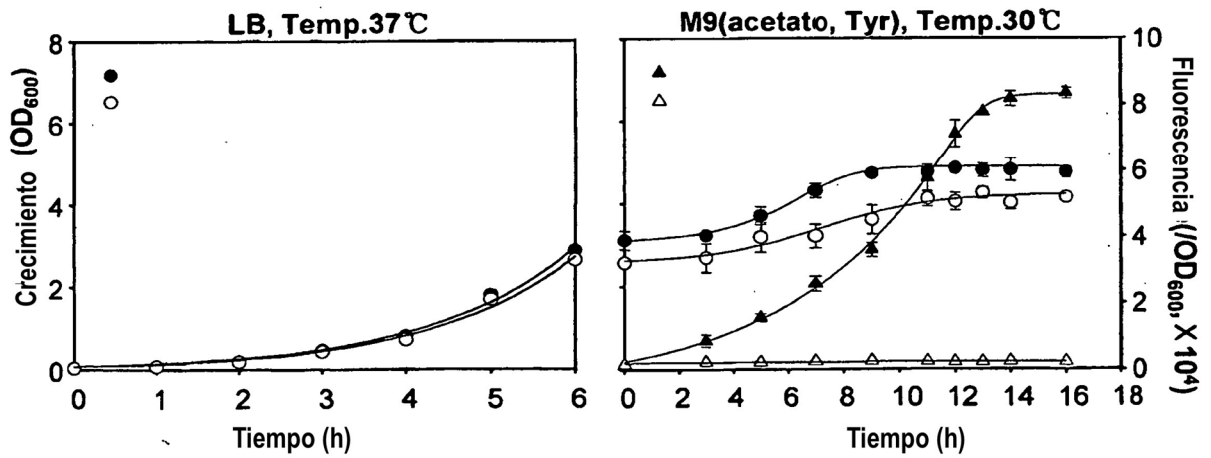


[FIG 19]

(A)

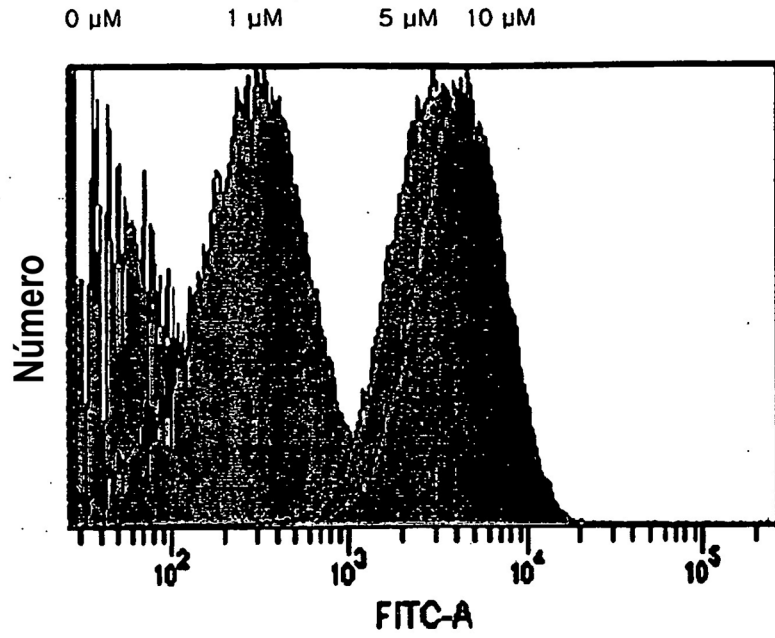


(B)

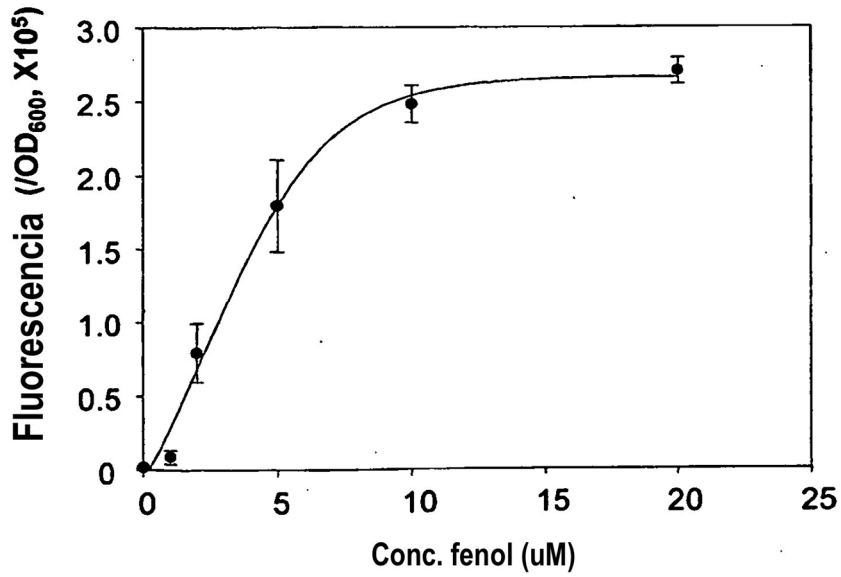


[FIG 19]

(C)

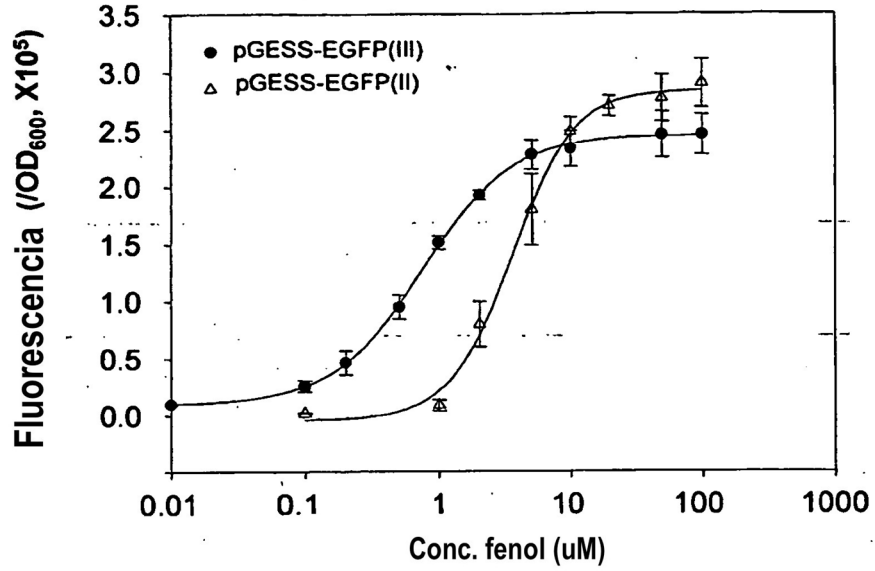


(D)

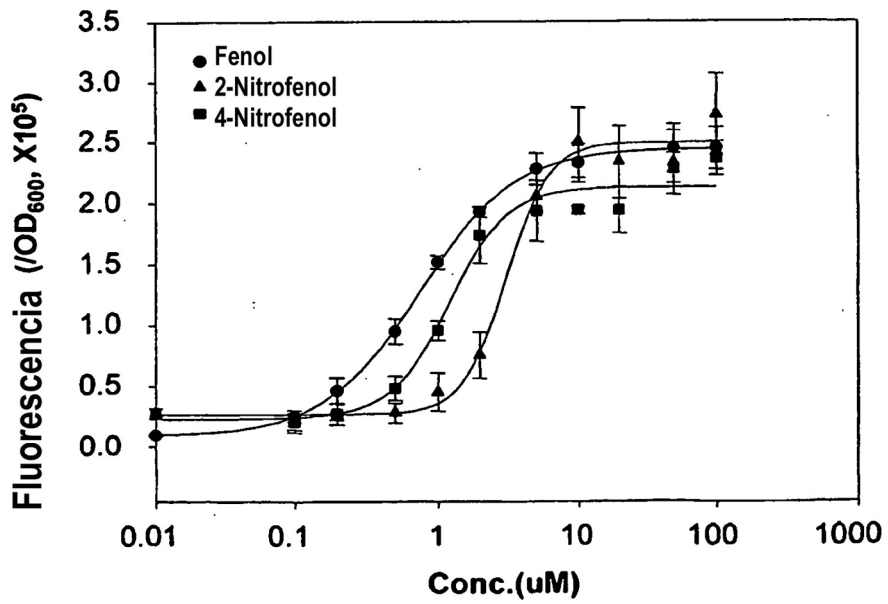


[FIG 20]

(A)

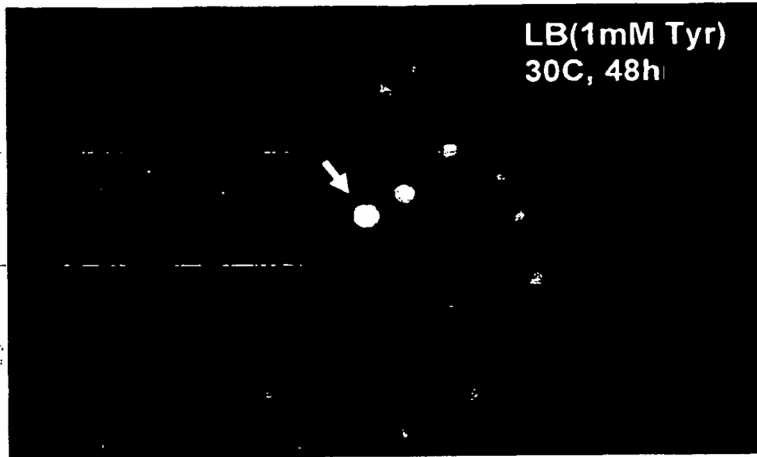


(B)

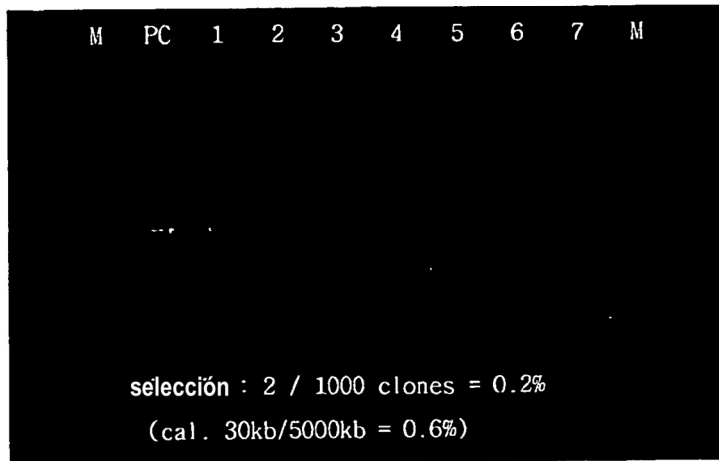


[FIG 21]

(A)



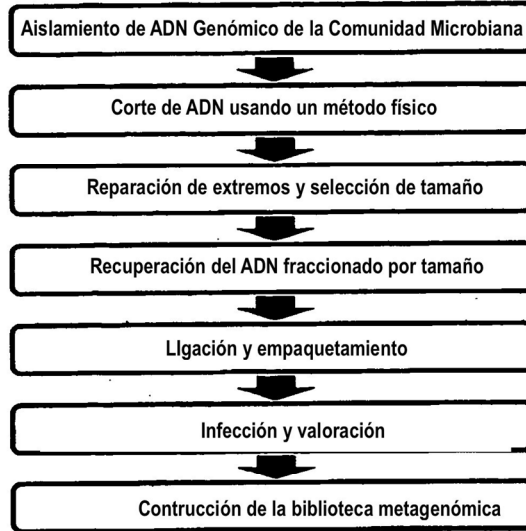
(B)



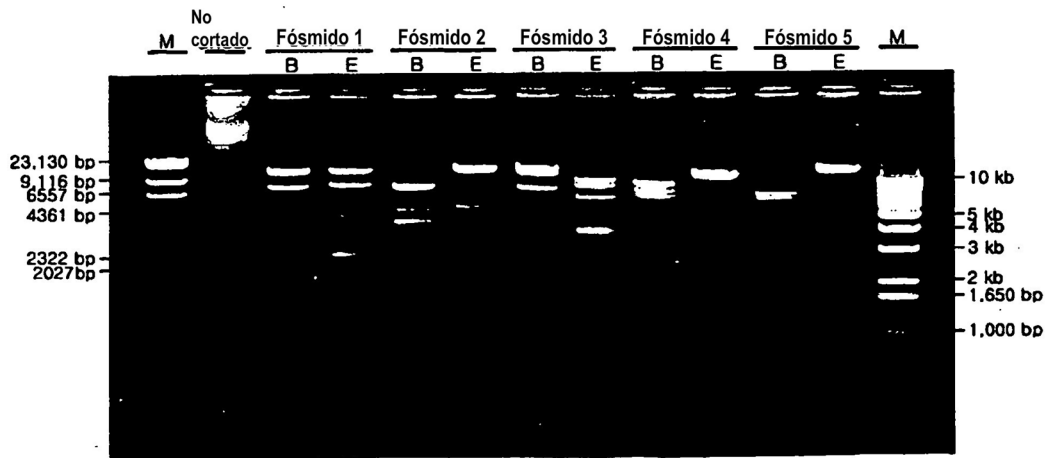
M: escalera 1kb
PC: gen TPLcf
1-7: candidatos

[FIG 22]

(A)



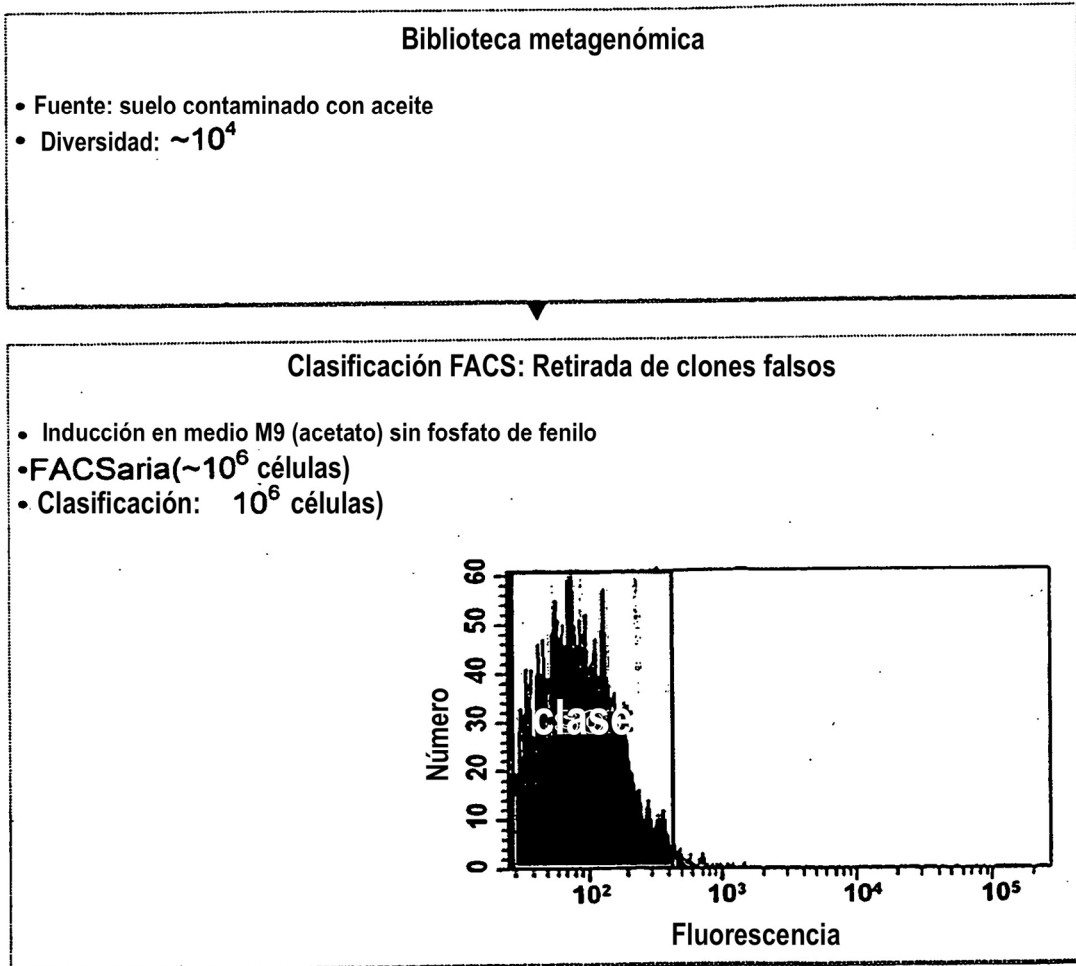
(B)



Fotografía de electroforesis de fósido digerido con enzimas de restricción (B; *BamH* 1, E; *EcoR* I)

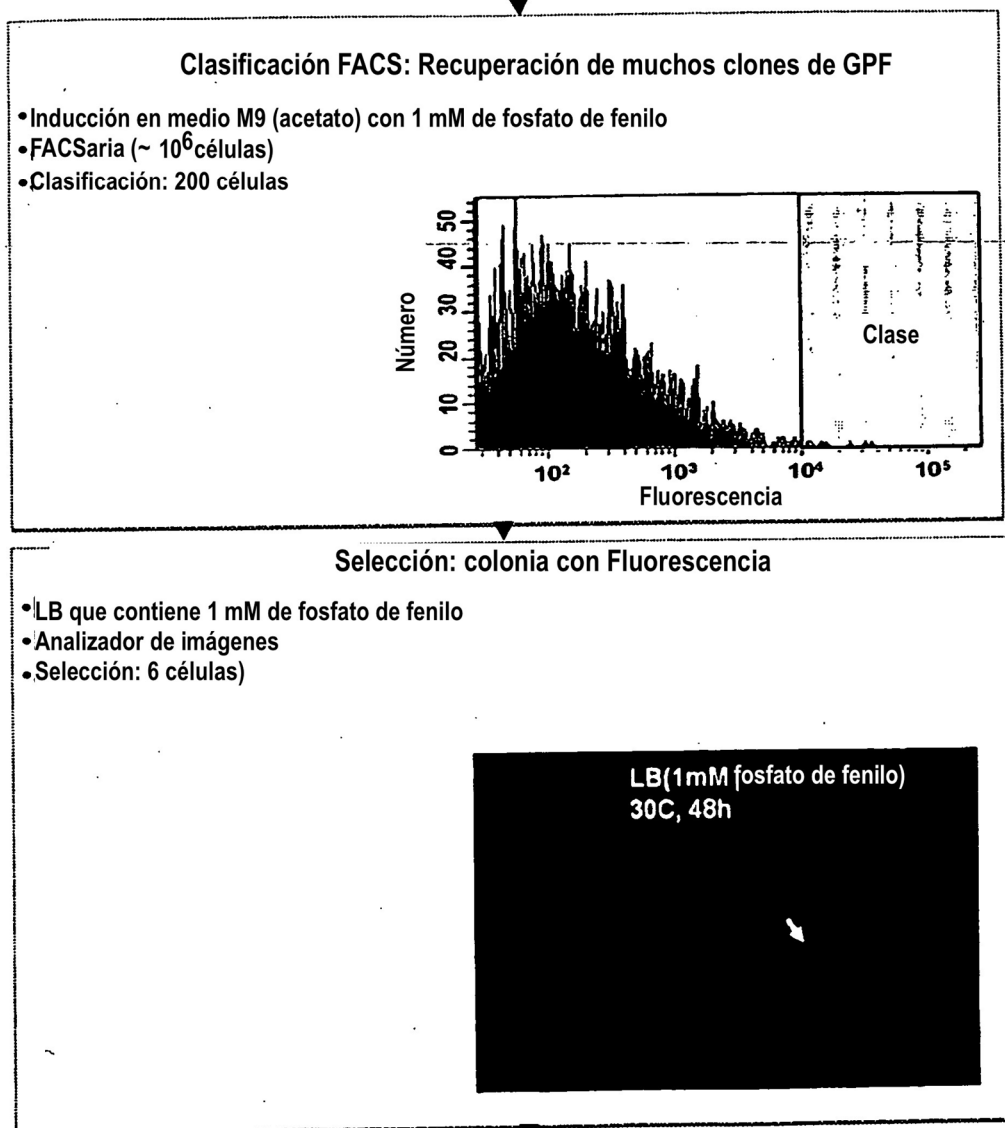
[FIG 23]

(A)



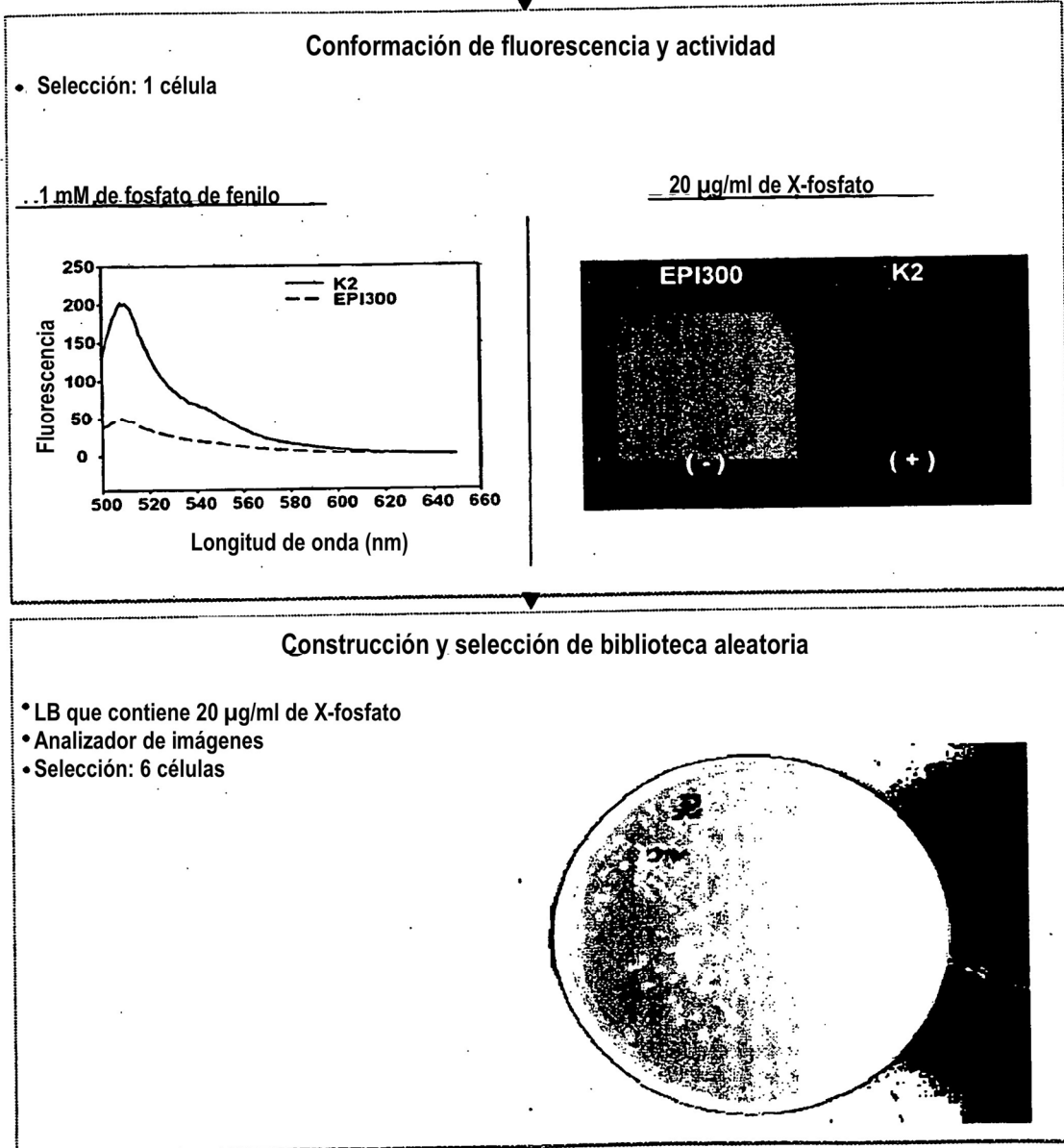
[FIG 23]

(B)



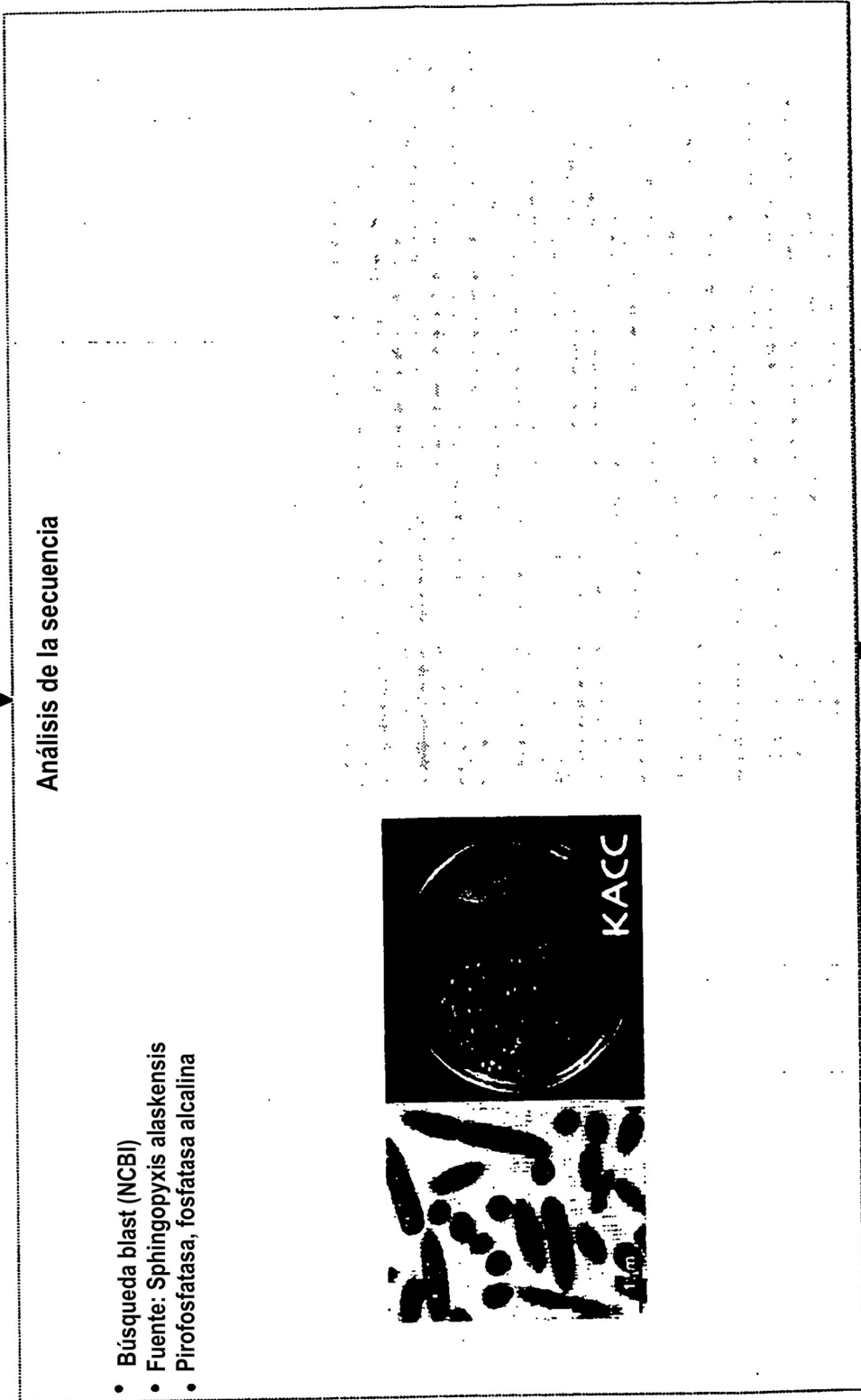
[FIG 23]

(C)

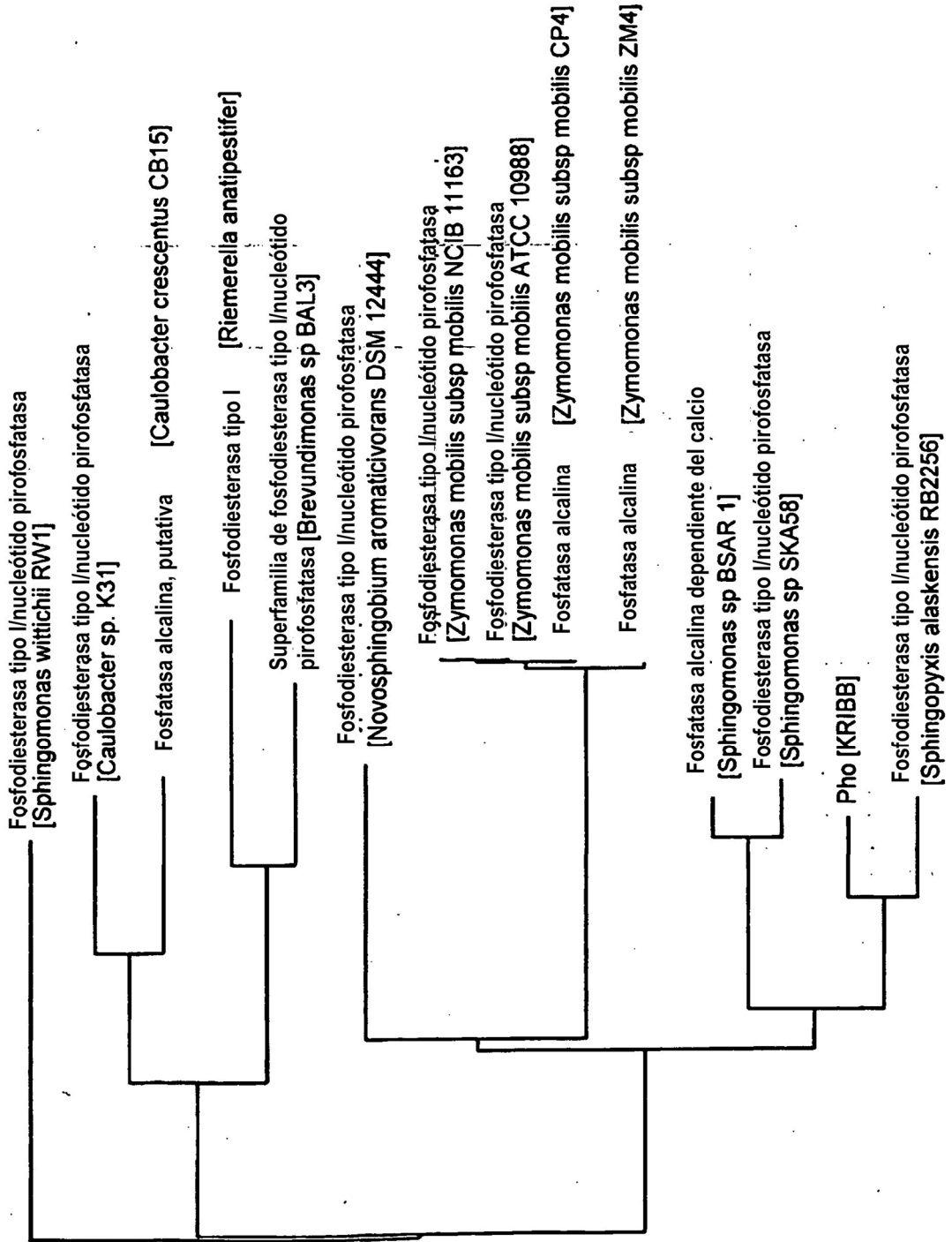


[FIG. 23]

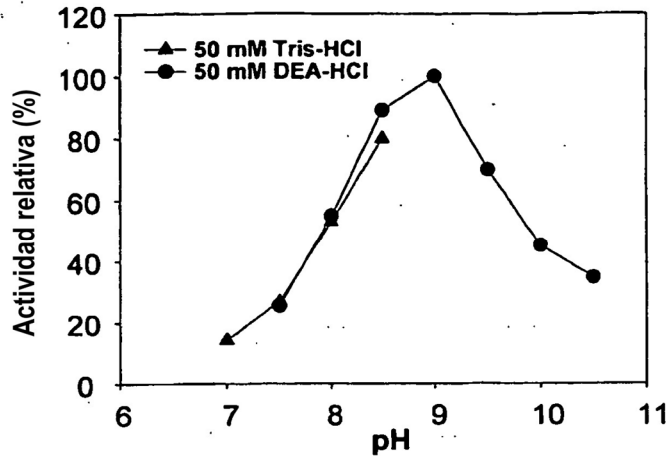
(D)



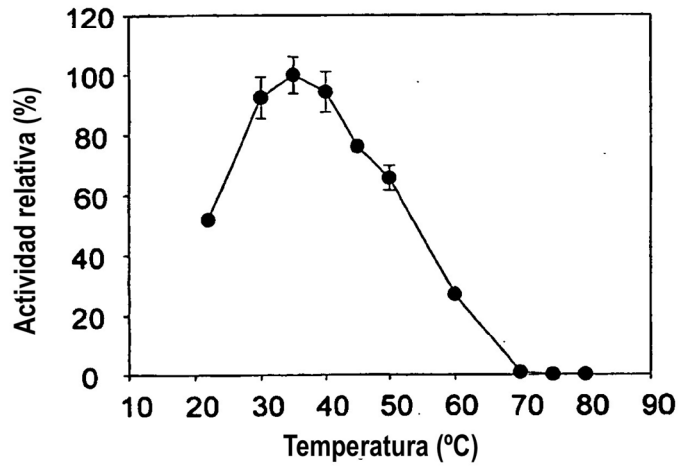
[FIG 24]



[FIG 25] (A)



(B)



(C)

