(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 645 467**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2013** **PCT/EP2013/002481**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14032777**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2013** **E 13752832 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2890810**

(54) Título: **Detector de NADP(H) y desarrollo de alcohol deshidrogenasas**

(30) Prioridad:

28.08.2012 DE 102012017026

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2017

(73) Titular/es:

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
Wilhelm-Johnen-Strasse
52425 Jülich, DE

(72) Inventor/es:

SIEDLER, SOLVEJ;
SCHENDZIELORZ, GEORG;
BINDER, STEPHAN;
EGGELING, LOTHAR;
BRINGER-MEYER, STEPHANIE y
BOTT, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 645 467 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

Detector de NADP(H) y desarrollo de alcohol deshidrogenasas

La presente invención se refiere a una célula, a un procedimiento para el aislamiento de genes que codifican enzimas dependientes de NADP(H), así como al uso de un nanodetector de NADP(H).

El uso de enzimas dependientes de NADP(H) en la industria química como catalizador se ha divulgado en una pluralidad de ejemplos. Así se usan alcohol deshidrogenasas, también denominadas oxidorreductasas o cetorreductasas, para la reducción de grupos carbonilo. En particular se usa la enantioespecificidad y regioespecificidad para la reducción de cetonas proquirales. Ejemplos de tales cetorreductasas que sirven para la síntesis de compuestos químicos útiles son la reducción asimétrica de ésteres de 4-cloroacetoacetato (documentos US 5.559.030, US 5.700.670 y US 5.891.685), la reducción de ácidos dicarboxílicos (documento US 6.399.339), la reducción de (S) cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo (documentos US 6.645.746 y WO-A-01/40450), la reducción de compuestos a base de pirrolotriazinas (documento LJS-A-2006/0286646), la reducción de acetofenonas sustituidas (documento US 6.800.477, US-A-2012/0178142) o la reducción de hidroxitiolanos (documento WO-A-2005/054491). Igualmente se reducen de manera enzimática alfa-halocetonas en alfa-halo-alcoholes. También esto puede realizarse mediante enzimas aisladas o con células completas (documento WO-A-2008/038050). Por medio de alcohol deshidrogenasas específicas de *Lactobacillus brevis* o *Thermoanaerobium brokii* se realiza la reducción del 8-cloro-6-oxooctanoato de alquilo para dar el (R) o (S)-8-cloro-6-hidroxioctanoato de alquilo, que en cada caso se usa como precursor del ácido (R)-α-lipoico y ácido (S)-α-lipoico (documento US 7.157.253). También se han descrito procedimientos para la preparación de alcanoles ópticamente activos, en los que mediante reducción enzimática de las correspondientes cetonas se realiza la preparación de por ejemplo (1S)-3-metilamino-1-(2-tienil)-propan-1-ol y (1S)-3-cloro-1-(2-tienil)-propan-1-ol (documento WO-A-2006/094945). Un procedimiento para preparar 3-hidroxibutiratos de 3-hidroxibutilo de manera enantioespecífica por medio de cetorreductasas o alcohol deshidrogenasas se conoce igualmente (documento US-A-2012/0064611). En el documento US 6.645.746 se divulga una secuencia de aminoácidos de *Candida magnoliae*, que puede usarse para reducir (5S)-6-cloro-5-hidroxi-3-oxohexanoato de terc-butilo en (3R,5S)-6-cloro-3,5-dihidroxihexanoato de terc-butilo con ayuda de NADP(H). En la descripción de este documento se usa la enzima preferentemente de manera coexpresada con glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium*, realizándose la regeneración del cofactor NADP(H) con ayuda de la glucosa deshidrogenasa y con glucosa como cosustrato. El documento WO-A-2004/111083 describe un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de cetonas, en particular de ésteres de 2- y 3-oxoácidos, catalizándose la reacción por una oxidorreductasa de *Pichia capsulata*. En el documento WO-A-2005/108593 se describe un procedimiento para la preparación de 1-butanol, en el que se reduce 2-butanona con una carbonil reductasa, por ejemplo de *Candida parapsilosis*, y una coenzima en un sistema de dos fases. En el documento EP-A-2 061 880 se ha divulgado un procedimiento para la preparación enzimática dependiente de NADP(H) de derivados de alquenona a partir de derivados de alquinona α,β-insaturados, pudiéndose usar la correspondiente reductasa en forma adecuada o también en forma del propio microorganismo.

En el documento EP-A-2 087 127 se describe un procedimiento para la preparación de derivados de secol mediante reducción enzimática enantioselectiva de derivados de secodiona usando una oxidorreductasa/deshidrogenasa en presencia de NADP(H).

Además de la reducción dependiente de NADP(H) de cetonas y aldehídos se usan enzimas dependientes de NADP(H), las denominadas enoato reductasas, también para la reducción enantioespecífica de enoatos. Así informaron Kataoka y colaboradores que mediante el uso de una enoato reductasa de *Candida macedoniensis* junto con una glucosa deshidrogenasa de *E. coli* que genera NADP(H) se reduce de manera preparativa cetoisoforona en (6R)-levodionas (Kataoka, Kotaka, Thiwthong, Wada, Nakamori, and Shimizu, J. Biotechnol., 2004, 114, 1-9).

Además se describe el uso de enzimas dependientes de NADP(H) en sistemas acoplados, donde por ejemplo a la reducción está conectada posteriormente una ciclación para dar el epóxido. Así se describe el uso de alcohol deshidrogenasas (R)- o (S)-selectivas para formar el correspondiente enantiómero y conseguir a continuación la ciclación inducida por bases para dar el respectivo epóxido (documento CA 2 612 407).

La facilitación enzimática de NADP(H) es también necesaria cuando se usan monooxigenasas, tal como en el caso de la monooxigenasa muy bien estudiada P450 BM3 (CYP102A1) de *Bacillus megaterium* (Appl. Microbiol. Biotechnol. (2012) 95:357-367). Esta ácido graso hidroxilasa oxida una amplia paleta de sustratos, como alcanos, alquenos e hidrocarburos aromáticos. La monooxigenasa cataliza la hidroxilación, sin embargo ésta requiere el suministro estequiométrico de NADP(H).

También se usan enzimas dependientes de NADP(H) para la aminación reductora, como por ejemplo de 2-cetoácidos para dar el correspondiente D-aminoácido (documento WO-A-2006/113085), o de ácido 6-aminocaprónico a partir de 2-cetopimelato (documento WO-A-2012/031911).

Un resumen de las más diversas aplicaciones de enzimas dependientes de NADP(H) puede extraerse por ejemplo de Hollmann, Arendsa y Holtmann (Green Chemistry, 2011, 13, 2285-2313), o también del manual “Industrial Biotransformations” de Liese, Seelbach, y Wandrey (Wiley-VCH Verlag, 2006, ISBN: 3-527-31001-0).

Independientemente de para qué conversión concreta deben usarse enzimas dependientes de NADP(H), es en primer lugar una condición previa poner a disposición enzimas adecuadas que garanticen altas conversiones y una alta estereoespecificidad. Esto supone además una selección de tales enzimas que puede realizarse de manera distinta.

Así empresas ofrecen colecciones de enzima que deben someterse a prueba entonces si éstas convierten el producto de partida deseado en el producto deseado, como por ejemplo Novozymes A/S con sede en Bagsvaerd, Dinamarca. Las enzimas deseadas pueden usarse también mediante aprovechamiento de la diversidad natural. Por ejemplo, obteniéndose enzimas de organismos o bancos de metagenomas, que a su vez deben someterse a prueba de manera específica. La diversidad puede prepararse también mediante el ser humano, sometiéndose a mutagénesis las enzimas existentes y sometiéndose a prueba a continuación las enzimas obtenidas para determinar la especificidad de sustrato modificada. Ejemplos para la generación de diversas enzimas mediante técnicas moleculares se divulgan en el documento WO-A-2012/069434, donde se obtienen enzimas dependientes de NADP(H) para la preparación de alcoholes ópticamente activos n-heterocíclicos. También se describen procedimientos similares para la preparación de 12 mutantes de α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (documento EP-A-2 441 771). La preparación de bancos de genes grandes, que están sujetos a un análisis con alto rendimiento, comprende la clonación del banco génico en vectores de expresión que pueden replicarse, la transformación de las células adecuadas con el banco de vectores resultante y la expresión de los genes obtenidos de manera combinatoria en condiciones, con las que se facilita la detección de la actividad deseada y el aislamiento del vector, que codifica el gen cuyo producto se detectó.

La prueba directa para determinar la conversión deseada del producto de partida en el producto se realiza hasta ahora preferentemente en placas de microtitulación con 96, 384 o también 1536 pocillos (“*wells*”). Estas placas permiten el ensayo paralelo de 96, 384, o 1536 enzimas. El producto de la reacción enzimática deseada puede determinarse directamente mediante técnicas cromatográficas. Este procedimiento requiere la extracción de una muestra de los 96, 384 o 1536 pocillos y la separación cromatográfica para la detección de los productos de reacción, en el caso de los cuales puede tratarse por ejemplo de alcoholes o compuestos de carbonilo. Un proceso de este tipo es sin embargo complejo y requiere tiempo. Debido a ello se usan con frecuencia pruebas indirectas.

Así se aprovecha que NADP(H) absorbe en 340 nm, sin embargo no NADP. Además puede determinarse en principio la cantidad de NADP(H) consumida. Como alternativa puede medirse así también, en la oxidación de un alcohol catalizada con carbonil reductasa, la conversión de NADP en NADP(H). En esta reacción y en reacciones comparables se determina la reducción del co-factor NADP mediante aumento de la absorción en 340 nm. Igualmente puede usarse también la fluorescencia propia del cofactor reducido para la cuantificación. Esto se realiza en aparatos de lectura de microtitulación.

En otro procedimiento para la determinación del consumo de NADP(H) para la detección de la transaminación reductora enzimática y también la reducción de cetonas se determina la modificación del pH que va acompañada del consumo de NADP(H) mediante un indicador de color (documento US 7.642.073). Mediante una elección adecuada del indicador de color puede determinarse la longitud de onda de la modificación de color, que se determina a su vez en aparatos de lectura de microtitulación.

También se describen sistemas de placas de microtitulación especiales, en los que a través de membranas con propiedades de unión a analito específicas y flujos de líquido se realiza una selección en el formato de placas de microtitulación con hasta 1536 pocillos (documento EP-A-1 628 768).

También se ha intentado poder detectar más fácilmente analitos mediante acoplamiento con un grupo detectable, por ejemplo un fluoróforo. Para ello se une el analito antes de la realización de la reacción de manera covalente con un grupo fluorescente. Durante la realización de la reacción y la correspondiente conversión del analito debe modificarse la fluorescencia del grupo fluorescente, por ejemplo mediante disociación del grupo o mediante modificación de la estructura del analito. La modificación de la fluorescencia es entonces una medida de la conversión del analito. Es desventajoso en este caso sin embargo que el grupo fluorescente influya con frecuencia en la capacidad de reacción del analito. En el documento WO-A-2007/131696 se describe que mediante la facilitación de un colorante fluorescente y de un macrociclo en la muestra que va a someterse a estudio y la medición de una propiedad fluorescente del colorante fluorescente puede determinarse en al menos dos momentos la concentración de analito. A este respecto se une el macrociclo al colorante y dentro del intervalo de concentración del analito que va a someterse a estudio desplaza éste el colorante fluorescente del macrociclo.

En los planteamientos de selección *in vitro* conocidos por el estado de la técnica para el aislamiento de nuevas enzimas que consumen NADP(H) o enzimas que consumen NADP(H) de bancos génicos con especificidad de sustrato modificada es un inconveniente general que se usan sistemas de placas de microtitulación que no permiten

ninguna selección de alto rendimiento, tal como es esto posible por ejemplo con clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, *fluorescence activated cell sorting*).

Además se usan en planteamientos de selección *in vitro* para el aislamiento de nuevas enzimas dependientes de NADP(H) con frecuencia lisados celulares como fuente potencial de nuevas enzimas, dado que el aislamiento en forma pura es operacionalmente difícil. El problema de tales lisados o preparados en la selección de rutina de nuevas enzimas dependientes de NADP(H) consiste sin embargo en que la mezcla de reacción contiene normalmente material no soluble u otras enzimas, que interaccionan con el NADP(H). Esto conduce a altos valores ciegos o también absorción inespecífica modificada en 340 nm, lo que merma la exactitud y el valor de la medición de absorción. Lo mismo se aplica para la medición de fluorescencia del cofactor, que se dificulta igualmente mediante material insoluble.

Adriana R. Krapp *et al.* ("The SoxRS response of Escherichia coli can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH contents", Microbiology 157(4), páginas 957-965 (2011)) se ocupan del regulón de soxRS en *E. coli.* Se determina que la activación del regulón de soxRS en células de *E. coli*, que están expuestas a compuestos que fomentan la formación de superóxido, se desencadena más bien mediante la degradación del conjunto de NADPH mediante el enriquecimiento del propio superóxido.

Jin Hyung Lee *et al.* ("An oxidative stress-specific bacterial cell array chip for toxicity analysis", Biosens Bioelectron. 22(9-10), páginas 2223-2229 (2006)) describen un chip de matriz bacteriana específica para estrés oxidativo, que se usa para análisis de toxicidad.

Yang Hee Kim *et al.* ("Iron oxide/carbon black (Fe203/CB) composite electrode for the detection of reduced nicotinamide cofactors using an amperometric method under a low overpotential", Biosens Bioelectron. 25(5), páginas 1160-1165 (2009)) describen un biodetector amperométrico para la detección de los co-factores NADP y NADPH basándose en la oxidación electroquímica de NADPH con un electrodo de óxido de hierro/CB.

El documento CN 101386828 B divulga una cepa de *E. coli*, que se ha obtenido habiéndose desactivado en la cepa de *E. coli* MC4100 los genes *sodA*, *sodB*, *katG*, *ahpCF* y *frdABCD* y habiéndose introducido el gen *soxS* así como el gen indicador *gfp* por medio de procedimientos recombinantes. Las células sirven para la detección de toxinas redoxactivas.

La presente invención se basa en el objetivo de superar los inconvenientes que resultan del estado de la técnica en relación con el aislamiento de nuevas enzimas dependientes de NADP(H).

En particular, la presente invención se basa en el objetivo de poner a disposición una herramienta que pueda usarse para poder aislar en una selección de alto rendimiento, por ejemplo por medio de FACS, a partir de una suspensión celular de la manera más sencilla posible aquellas células que expresan eventualmente nuevas enzimas dependientes de NADP(H). En particular, el aislamiento de estas células no debe comprender ninguna disrupción celular y en particular tampoco ninguna determinación analítica de la concentración de determinados productos de partida, productos o co-factores.

Además, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar una célula que, después de se haya introducido un gen para una posible enzima dependiente de NADP(H) por ejemplo en forma de un plásmido en la célula, pueda analizarse por el contrario de manera especialmente fácil y en particular sin la necesidad de una disrupción celular, si el gen expresado por esta célula en el Tat codifica una enzima dependiente de NADP(H). Una célula identificada de esta manera debía poder separarse de manera dirigida además a ser posible en una selección de alto rendimiento, por ejemplo por medio de FACS, de una pluralidad de células, por ejemplo de una suspensión celular.

A la solución de los objetivos mencionados anteriormente contribuye una célula que contiene un nanodetector de NADP(H), en la que el nanodetector de NADP(H) comprende

i) una secuencia de ácido nucleico, a la que puede unirse un regulador, en la que el estado de oxidación del regulador depende de la disponibilidad de NADP(H);

ii) una secuencia de promotor que sigue a la secuencia de ácido nucleico i), a la que puede unirse una ARN-polimerasa, en la que la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor se ve influida por el estado de oxidación del regulador;

iii) una secuencia de ácido nucleico que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor ii), que codifica una proteína de autofluorescencia, en la que la secuencia de ácido nucleico i) es la secuencia de unión a SoxR, el regulador es el regulador de Sox (SoxR) y la secuencia de promotor es la secuencia de promotor de soxS y en la que la célula comprende además un plásmido con un gen eventualmente mutado, que codifica una enzima dependiente de NADP(H).

Sorprendentemente se determinó que usando el nanodetector de NADP(H) puede determinarse de manera especialmente fácil in vivo la concentración intracelular de NADP o bien NADP(H) y con ello indirectamente la actividad de enzimas dependientes de NADP(H) en una célula. Si una célula que presenta el nanodetector de NADP(H) está caracterizada por una alta actividad de enzimas dependientes de NADP(H), entonces es la concentración de NADP correspondientemente alta (y la concentración de NADP(H) correspondientemente baja).

Dependiendo de este estado de reducción de la puede influir el regulador en la afinidad de la ARN-polimerasa para el promotor que controla la expresión de la proteína de autofluorescencia o en la estabilidad del ARNm que codifica la proteína de autofluorescencia. Dependiendo del estado de reducción de la célula se controla por consiguiente la expresión de la proteína de autofluorescencia, que puede seguirse a su vez de manera sencilla mediante la irradiación con radiación electromagnética, que excita la proteína de autofluorescencia para la emisión de luz. La emisión de luz de las células es por consiguiente un indicador del estado de reducción de la célula y por lo tanto de la dimensión de la expresión de enzimas dependientes de NADP(H).

De acuerdo con la invención, en el caso del regulador se trata del regulador de Sox (SoxR) y en el caso de la secuencia de promotor se trata de la secuencia de promotor de soxS. El gen para SoxR de *E. coli* K12 está depositado con los números de acceso b4063, ECK4055 en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de la *National Library of Medicine* (Bethesda, MD, EE.UU.). SoxR contiene dos agrupaciones de [2Fe-2S], que son esenciales para la actividad de la transcripción. Cada polipéptido SoxR contiene un agrupación de [2Fe-2S], que detecta el estado de reducción de la célula. Tanto Fe-SoxR como apo-SoxR se unen a la región de promotor, sin embargo sólo Fe-SoxR contribuye a la activación del promotor en la forma oxidada. El estado redox de la agrupación de hierro-azufre regula la actividad de SoxR. El gen diana de SoxR es el *soxS* adyacente, cuya secuencia está depositada con los números b4062, ECK4054 en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.). El estado de reducción de la célula puede favorecerse eventualmente mediante reductasas dependientes de NADP(H), como Rsx o RseC.

En este contexto se prefiere además que los componentes i) y ii) se formen por la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre *soxR* y *soxS* y que comprende la secuencia de unión a SoxR, la secuencia de promotor de *soxS* que sigue a la secuencia de unión a SoxR y una secuencia que sigue a la secuencia de promotor de soxS, que corresponde en el plano del ARNm a un sitio de unión a ribosoma, o por una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto. Los componentes i) y ii) se forman a este respecto preferentemente por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que está constituido por:

a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ.-ID-Nr. 01,

b) una secuencia de ácido nucleico, que presenta una identidad de al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente al menos el 85 %, aún más preferentemente al menos el 90 %, aún más preferentemente al menos el 91 %, aún más preferentemente al menos el 92 %, aún más preferentemente al menos el 93 %, aún más preferentemente al menos el 94 %, aún más preferentemente al menos el 95 %, aún más preferentemente al menos el 96 %, aún más preferentemente al menos el 97 %, aún más preferentemente al menos el 98 % y lo más preferentemente al menos el 99 % a la secuencia de ácido nucleico de a), pudiéndose unir la secuencia de ácido nucleico a SoxR de manera que la afinidad de la ARN-polimerasa para el promotor de *soxS* dependa del estado de oxidación de SoxR, y

c) una secuencia de ácido nucleico, que puede hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico complementaria según a) o b), pudiéndose unir la secuencia de ácido nucleico a SoxR de manera que la afinidad de la ARN-polimerasa para el promotor de *soxS* dependa del estado de oxidación de SoxR.

De acuerdo con una primera variante de esta forma de realización especialmente preferente del nanodetector de NADP(H) comprende ésta

(α1) el gen de *E. coli* para SoxR (*soxR*) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;

(α2) la región intergénica de *E. coli* que sigue a (α1), que está localizada entre *soxR* y *soxS* y que comprende la secuencia de unión a SoxR, la secuencia de promotor de *soxS* que sigue a la secuencia de unión a SoxR y una secuencia que sigue a la secuencia de promotor de soxS, que corresponde en el plano del ARNm a un sitio de unión a ribosoma, o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto, tal como se ha definido anteriormente, como componentes i) y ii);

(α3) eventualmente una secuencia parcial que sigue a (α2) del gen *soxS* de *E. coli* o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;

(α4) una secuencia de ácido nucleico que sigue a (α2) o (α3), preferentemente a (α3) y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de *soxS*, que codifica una proteína de autofluorescencia, como componente iii).

La formulación "*una secuencia b) que sigue a una secuencia a)*", tal como se ha usado anteriormente y tal como se usa a continuación, ha de entenderse de acuerdo con la invención de modo que la secuencia b) no debe estar unida forzosamente de manera directa con la secuencia a), sino que puede estar localizada también una secuencia intermedia entre la secuencia a) y la secuencia b).

Como componente (α1) comprende el nanodetector de NADP(H) de acuerdo con esta configuración especial el gen de *E. coli* para SoxR (*soxR*) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto, en el que el componente (α1) preferentemente se selecciona del grupo que está constituido por:

a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ.-ID-Nr. 02,

b) una secuencia de ácido nucleico, que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ.-ID-Nr. 03,

c) una secuencia de ácido nucleico, que presenta una identidad de al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente al menos el 85 %, aún más preferentemente al menos el 90 %, aún más preferentemente al menos el 91 %, aún más preferentemente al menos el 92 %, aún más preferentemente al menos el 93 %, aún más preferentemente al menos el 94 %, aún más preferentemente al menos el 95 %, aún más preferentemente al menos el 96 %, aún más preferentemente al menos el 97 %, aún más preferentemente al menos el 98 % y lo más preferentemente al menos el 99 % a la secuencia de ácido nucleico de a) o b), en la que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido, que puede unirse a la secuencia de unión a SoxR en la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre *soxR* y *soxS*, y cuyo estado de oxidación puede influir en la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor localizada igualmente en la región intergénica de *E. coli*,

d) una secuencia de ácido nucleico, que codifica un polipéptido, que presenta una homología de al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente al menos el 85 %, aún más preferentemente al menos el 90 %, aún más preferentemente al menos el 91 %, aún más preferentemente al menos el 92 %, aún más preferentemente al menos el 93 %, aún más preferentemente al menos el 94 %, aún más preferentemente al menos el 95 %, aún más preferentemente al menos el 96 %, aún más preferentemente al menos el 97 %, aún más preferentemente al menos el 98 % y lo más preferentemente al menos el 99 % a la SEQ.-ID.-Nr. 03, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido, que puede unirse a la secuencia de unión a SoxR en la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre *soxR* y *soxS*, y cuyo estado de oxidación puede influir en la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor localizada igualmente en la región intergénica de *E. coli*, y

e) una secuencia de ácido nucleico, que puede hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico complementaria según uno de los grupos a) a d), en la que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido, que puede unirse a la secuencia de unión a SoxR en la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre *soxR* y *soxS*, y cuyo estado de oxidación puede influir en la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor localizada igualmente en la región intergénica de *E. coli*.

La expresión "homología" (o "identidad"), tal como se usa en el presente documento, puede definirse mediante la ecuación H (%) = [1-V/X] x 100, en la que H significa homología, X es el número total de nucleobases/aminoácidos de la secuencia de comparación y V es el número de nucleobases/aminoácidos distintos de la secuencia que va a observarse con respecto a la secuencia de comparación. En cualquier caso están comprendidas con el término secuencias de ácidos nucleicos, que codifican polipéptidos, todas las secuencias que aparecen a ser posible de acuerdo con la degeneración del código genético.

La identidad de secuencias de ácido nucleico puede identificarse usando un programa de comparación de secuencias (BLAST, Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-410). La homología porcentual entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por el experto sin más igualmente con procedimientos conocidos por el estado de la técnica. Un programa adecuado que puede usarse de acuerdo con la invención es BLASTp (Altschul *et al.* 1997; "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402).

El experto encuentra instrucciones para la hibridación entre otras cosas en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la empresa Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl *et al.* (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir se forman sólo híbridos, en cuya sonda, por ejemplo la secuencia de nucleótidos complementaria a *soxR* o *soxS* o a la región intergénica de *soxRS* de *E. coli*, y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticos al menos el 70 %. Se sabe que la rigurosidad de la hibridación incluyendo las etapas de lavado se influye o se determina variando la composición de tampón, la temperatura y la concentración de sal. La reacción de hibridación se realiza en general con rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, R.U., 1996). Para la reacción de hibridación puede usarse, por ejemplo, un tampón que corresponde a 5 x tampón SSC a una temperatura de aprox.

50 ºC - 68 ºC. A este respecto pueden hibridar sondas también con polinucleótidos, que presentan menos del 70 % de identidad con respecto a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se separan mediante lavado en condiciones rigurosas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante reducción de la concentración de sal hasta 2 x SSC y eventualmente a continuación 0,5 x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aprox. 50 ºC - 68 ºC, aprox. 52 ºC - 68 ºC, aprox. 54 ºC - 68 ºC, aprox. 56 ºC - 68 ºC, aprox. 58 ºC - 68 ºC, aprox. 60 ºC - 68 ºC, aprox. 62 ºC - 68 ºC, aprox. 64 ºC - 68 C, aprox. 66 ºC - 68 ºC. Preferentemente se realizan las etapas de lavado a temperaturas de aprox. 62 ºC - 68 ºC, preferentemente de 64 ºC - 68 ºC o aprox. 66 ºC - 68 ºC, de manera especialmente preferente de aprox. 66 ºC - 68 ºC. Es posible eventualmente reducir la concentración de sal hasta una concentración que corresponde a 0,2 x SSC o 0,1 x SSC. Mediante aumento gradual de la temperatura de hibridación en etapas de aprox. 1 - 2 ºC de 50 ºC a 68 ºC pueden aislarse fragmentos de polinucleótidos, que codifican *soxR* o *soxS* o la región intergénica de *soxRS*, que tienen por ejemplo al menos el 70 % o al menos el 80 % o al menos del 90 % al 95 % o al menos del 96 % al 98 % o al menos el 99 % de identidad a la secuencia de la sonda usada. Otras instrucciones para la hibridación pueden obtenerse en forma de los denominados kits en el mercado (por ejemplo DIG Easy Hyb de la empresa Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n.º de catálogo 1603558).

Como componente (α4) comprende el nanodetector de NADP(H) de acuerdo con esta configuración especial una secuencia de ácido nucleico que sigue a (α2) o (α3), preferentemente al gen diana *soxS* (α3), en particular a los primeros 5 a 200 nucleótidos del gen diana *soxS* y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de *soxS*, que codifica una proteína de autofluorescencia, como componente iii).

La secuencia génica que codifica la proteína de autofluorescencia de acuerdo con el componente iii) se encuentra de acuerdo con la invención bajo el control de la secuencia de promotor ii) (de acuerdo con la primera variante descrita anteriormente de la forma de realización especial del nanodetector de NADP(H) se encuentra la secuencia génica (α4) que codifica la proteína de autofluorescencia bajo el control de la secuencia de promotor de *soxS*). El término "bajo el control de la secuencia de promotor" ha de entenderse a este respecto preferentemente de modo que la secuencia génica que codifica la proteína de autofluorescencia esté enlazada con el promotor de manera funcional. El promotor y la secuencia génica que codifica la proteína de autofluorescencia están enlazados de manera funcional cuando estas dos secuencias así como eventualmente otros elementos reguladores, como por ejemplo un terminador o un sitio de unión a ribosoma, están dispuestos secuencialmente de manera que cualquiera de los elementos reguladores pueda cumplir su función durante la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico. Para ello no es forzosamente necesario un enlace directo en el sentido químico. Las secuencias de control genéticas, como por ejemplo secuencias potenciadoras, pueden ejercer su función también desde posiciones más alejadas o incluso desde otras moléculas de ADN sobre la secuencia diana. Se prefieren disposiciones en las que se posiciona la secuencia génica que codifica la proteína de autofluorescencia detrás (es decir en el extremo 3') de la secuencia de promotor, de modo que las dos secuencias estén unidas entre sí de manera covalente.

Preferentemente, a este respecto, la distancia entre la secuencia génica que codifica la proteína de autofluorescencia y la secuencia de promotor es más pequeña de 200 pares de bases, de manera especialmente preferente es más pequeña de 100 pares de bases, de manera muy especialmente preferente es más pequeña de 50 pares de bases. También es posible que la secuencia génica que codifica la proteína de autofluorescencia y el promotor estén enlazados entre sí de manera funcional de manera que entre estas dos secuencias génicas se encuentre aún una secuencia parcial del gen homólogo (o sea de aquel gen cuya expresión en la célula de tipo natural se regula mediante el promotor) (de acuerdo con la forma de realización especial descrita anteriormente del nanodetector de NADP(H) pueden encontrarse según esto partes del gen *soxS* de acuerdo con el componente (α3) entre la secuencia de promotor de soxS y la secuencia de ácido nucleico (α4) que codifica la proteína de autofluorescencia). Durante la expresión de un constructo de ADN de este tipo se obtiene una proteína de fusión a partir de la proteína de autofluorescencia y de la secuencia de aminoácidos, que se codifica por la correspondiente secuencia parcial del gen homólogo (= fusión traduccional). La longitud de tales secuencias parciales del gen homólogo no son críticas, siempre que la capacidad de función de la proteína de autofluorescencia, o sea su propiedad de fluorescer con excitación con luz de una determinada longitud de onda, no se altere de manera notable. En el caso de la forma de realización especial descrita anteriormente del nanodetector de NADP(H) comprende la secuencia parcial de soxS (α3) preferentemente al menos los primeros 5 nucleótidos, aún más preferentemente al menos los primeros 10 nucleótidos y aún más preferentemente al menos los primeros 20 nucleótidos, preferentemente sin embargo como máximo los primeros 200 nucleótidos, aún más preferentemente como máximo los primeros 150 nucleótidos y aún más preferentemente como máximo los primeros 100 nucleótidos del gen *soxS*.

La secuencia de ácido nucleico (iii) (o bien (α4) y (β4)) que codifica una proteína de autofluorescencia comprende preferentemente genes que codifican proteínas de fluorescencia, que codifican proteínas de fluorescencia del género *Aequora*, como la Green Fluorescent Protein (GFP), y variantes de la misma, que fluorescen en otra región de longitudes de onda (por ejemplo Yellow Fluorescent Protein (YFP), Blue Fluorescent Protein (BFP), Cyan Fluorescent Protein (CFP)) o su fluorescencia está reforzada (por ejemplo enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP), enhanced Blue Fluorescent Protein (EBFP) o enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP)). Además pueden usarse de acuerdo con la invención también secuencias génicas que

codifican otras proteínas de autofluorescencia, por ejemplo DsRed, HcRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, AcGFP, ZsYellow, tal como se conocen por BD Biosciences, Franclin Lakes, EE.UU. Igualmente puede usarse una proteína fotorreceptora que contiene un denominado dominio LOV. La proteína de autofluorescencia especialmente preferente es a este respecto EYFP.

De acuerdo con una segunda variante de la forma de realización especialmente preferente del nanodetector de NADP(H) comprende ésta

(β1) el gen de *E. coli* para SoxR (*soxR*) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;

(β2) la región intergénica de *E. coli* que sigue a (β1), que está localizada entre *soxR* y *soxS* y que comprende la secuencia de unión a SoxR, la secuencia de promotor de soxS que sigue a la secuencia de unión a SoxR y una secuencia que sigue a la secuencia de promotor de soxS, que corresponde en el plano del ARNm a un sitio de unión a ribosoma, o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto, tal como se ha definido anteriormente, como componentes i) y ii);

(β3) la secuencia del gen *soxS* de *E. coli* que sigue a (β2) y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de soxS, una secuencia parcial de este gen o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;

(β3') otra secuencia que sigue a (β3), que corresponde en el plano de ARNm a un sitio de unión a ribosoma;

(β4) una secuencia de ácido nucleico que sigue a (β3') y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de *soxS*, que codifica una proteína de autofluorescencia, como componente iii).

Como componentes (β1), (β2), (β3) y (β4) se prefieren aquellos componentes que se mencionaron ya anteriormente en relación con la primera variante de la forma de realización especialmente preferente del nanodetector de NADP(H) como componentes (α1), (α2), (α3) y (α4) preferentes. Durante la expresión de un constructo de ADN de este tipo se forma SoxS o un fragmento de esta proteínas y, de manera separada de esto, la proteína de autofluorescencia (= fusión transcripcional).

Como ejemplos de células adecuadas se mencionan en particular *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* u otra eubacteria, o también *Saccharomyces cerevisiae* u otra levadura.

Las células de acuerdo con la invención son adecuadas para detectar si determinadas secuencias génicas codifican una enzima dependiente de NADP(H). Para ello se introduce en a célula el gen que codifica una posible enzima dependiente de NADP(H) y se expresa. Tal como se ha descrito anteriormente, la emisión de luz de las células es un indicador del estado de reducción de la célula y por lo tanto de la dimensión de la expresión de enzimas dependientes de NADP(H).

Por una "enzima dependiente de NADP(H)" se entiende a este respecto de acuerdo con la invención cualquier enzima que toma parte en al menos una etapa parcial de la conversión de un sustrato en un producto de reacción químicamente distinto de este sustrato, tomando parte en al menos una etapa parcial de esta conversión NADP(H) como co-factor.

La célula de acuerdo con la invención comprende según esto además del nanodetector de NADP(H) adicionalmente un plásmido con un gen eventualmente mutado, que codifica una enzima dependiente de NADP(H). La enzima dependiente de NADP(H) se selecciona a este respecto preferentemente del grupo que está constituido por alcohol deshidrogenasas, aldehído deshidrogenasas, lactato deshidrogenasas, enoato reductasas, epóxido reductasas, diaminopimelato deshidrogenasas, aminoácido deshidrogenasas, aldehído oxidorreductasas, alcano reductasas, amino reductasas, epóxido deshidrogenasas, ácido carboxílico deshidrogenasas, hidroxiácido cetorreductasas e hidroxiácido deshalogenasas.

A la solución de los objetivos mencionados anteriormente contribuye también un procedimiento para el aislamiento de genes, que codifican enzimas dependientes de NADP(H), que comprende las etapas de procedimiento:

(I) facilitar un nanodetector de NADP(H), tal como se ha descrito anteriormente en relación con la célula de acuerdo con la invención;

(II) introducir el nanodetector de NADP(H) en una célula;

(III) introducir un gen, que codifica eventualmente una enzima dependiente de NADP(H), en células individuales de una suspensión celular de las células obtenidas en la etapa de procedimiento (II);

(IV) incubar las células con un sustrato para la enzima dependiente de NADP(H);

(V) identificar células individuales en la suspensión celular con elevada actividad de enzimas dependientes de NADP(H) mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular;

(VI) separar las células identificadas de la suspensión celular;

(VII) aislar genes que codifican una enzima dependiente de NADP(H) en las células identificadas.

Con ayuda de este procedimiento pueden aislarse nuevas enzimas dependientes de NADP(H) y enzimas dependientes de NADP(H) mutadas con reconocimiento de sustrato elevado o mutado.

Como detector de NADP(H) y como célula se prefieren aquellos detectores o bien células que se han descrito ya anteriormente en relación con la célula de acuerdo con la invención como detectores o bien células preferentes.

En las etapas de procedimiento I) y II) se prepara en primer lugar una célula de acuerdo con la invención, introduciéndose el nanodetector de NADP(H) en una célula, pudiéndose realizar esta introducción de forma episómica o cromosómica.

En la etapa de procedimiento III) del procedimiento de acuerdo con la invención se introduce entonces un gen, que codifica eventualmente una enzima dependiente de NADP(H), en células individuales de una suspensión celular de las células obtenidas en la etapa de procedimiento (II), pudiéndose tratar en el caso del gen en particular de un gen mutado, codificado por plásmido de una enzima dependiente de NADP(H). Para la introducción de las mutaciones inespecíficas de sitio en los genes codificados por plásmido de las enzimas dependientes de NADP(H) para el aumento de la diversidad se realiza preferentemente una mutagénesis in vitro con ayuda de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) defectuosa y una técnica de amplificación. A este respecto se somete el gen que va a mutarse a una PCR usando una polimerasa que, dependiendo de las condiciones de la reacción, incorpora bases individuales de manera errónea en los genes sintetizados (Tindall, K.R. and T.A. Kunkel: “Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase”; Biochemistry, 1988. 27 (16), páginas 6008-13). Una variante frecuente de este procedimiento incluye el uso de iones manganeso(II) o de análogos de nucleótidos en la mezcla de reacción de PCR (Cadwell R. C *et al*. (1992); PCR Methods Appl. (2), páginas 28-33./Leung D. W. *et al*. (1989) Techniques (1), páginas 11-15). Estas técnicas para la introducción de mutaciones se designan como “Error-Prone-PCR (epPCR)” (LabrouNE: “Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution”; Curr Protein Pept Sci. 2010 (11), páginas: 91-100). Las mutaciones pueden ser por ejemplo mutaciones puntuales, pueden generarse por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones mediante la polimerasa. La velocidad de mutación asciende a entre 1-40 mutaciones por 1 kb, preferentemente 1-5 mutaciones por 1 kb. Las mutaciones pueden prepararse sin embargo también con ayuda de la mutagénesis de saturación usando el kit QuikChange de Stratagene (La Jolla, California, EE.UU.), o también con un procedimiento designado como Sesam (documento EP 1670914 B1), con el que cada nucleótido existente se transforma de manera saturante en cualquier nucleótido posible.

Como enzimas dependientes de NADP(H), cuya actividad puede analizarse con el huésped que lleva el nanodetector en alto rendimiento, se tienen en cuenta por ejemplo 1,2-deshidroreticulina-reductasas (1.5.1.27), 2-enoil-CoA-reductasa (1.3.1.10), 2-enoil-CoA-reductasas (1.3.1.39), alquenal/alquenona-oxidorreductasas (1.3.1.74) citocromo-P450-reductasa (1.6.2.4), NADP(H)-deshidrogenasas (1.6.99.1), NADP(H)-deshidrogenasas (flavina) (1.6.8.2), NADP(H)-deshidrogenasas (quinona) (1.6.5.10), 1,5-anhidro-D-fructosa-reductasas dependientes de NADP(H) (1.1.1.263), citocromo-P450-reductasas dependientes de NADP(H) (1.6.2.4), diaforasas (1.6.99.1), DT-diaforasas (1.6.5.5), ferredoxina-reductasas (1.18.1.2), NADP(H)-oxidasas (1.6.3.1, 1.6.5.10, 1.6.3.1, 1.6.3.1, 1.6.3.1), P450-oxidorreductasa (1.6.2.4), P450-reductasa (1.6.2.4), peroxidasa (1.11.1.2), quinona-aceptor-oxidorreductasa (1.6.5.5), quinona-oxidorreductasa (1.6.5.10), FMN-reductasa dependiente de NADP(H) (1.5.1.38), tioredoxina-reductasa (1.8.1.9), transhidrogenasa (1.6.1.2), NADP(H)-aldehído-reductasa (1.1.1.2), aldopentosa-reductasa (1.1.1.21), NADP(H)-aldosa-reductasa (1.1.1.21), NADP(H)-carbonil-reductasa (1.1.1.184), NADP(H)-CYP-reductasa (1.6.2.4), NADP(H)-citocromo-c-oxidorreductasa (1.6.2.4), NADP(H)-citocromo-c-reductasa (1.1.1.2), NADP(H)-citocromo-f-reductasa (1.6.2.5), NADP(H)-citocromo-P450-reductasa (1.6.2.4) y la NADP(H)-citocromo-P450-reductasa (1.14.13.68).

Los plásmidos, que contienen mutaciones en genes de las enzimas dependientes de NADP(H), se introducen a continuación mediante transformación en los microorganismos, como por ejemplo *E. coli* o *C. glutamicum*. El término “transformación” comprende a este respecto todos los procedimientos para la transferencia de polinucleótidos, en particular ADN, en una bacteria deseada. A esto pertenecen entre otras cosas el uso de ADN aislado en la transformación, electrotransformación o bien electroporación, la transferencia mediante contacto celular como en la conjugación o la transferencia de ADN por medio de bombardeo de partículas.

Después de que se haya introducido (y expresado) en la etapa de procedimiento (III) un gen que codifica eventualmente una enzima dependiente de NADP(H) en células individuales de una suspensión celular de las células obtenidas en la etapa de procedimiento (II), se incuban las células entonces en la etapa de procedimiento (IV) con un sustrato para una enzima dependiente de NADP(H) y en la etapa de procedimiento (V) se identifican entonces células individuales en la suspensión celular con elevada actividad de enzimas dependientes de NADP(H) mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular. Para esto se expone la suspensión celular a

radiación electromagnética en aquella frecuencia que excita la proteína de autofluorescencia del nanodetector de NADP(H) para la emisión de luz.

En la etapa de procedimiento (VI) se separan entonces las células identificadas de la suspensión celular, realizándose esta separación preferentemente por medio de citometría de flujo (FACS = *fluorescence activated cell sorting*), de manera especialmente preferente por medio de citometría de flujo alto (HT-FACS = *high througput fluorescence activated cell sorting*). Las particularidades con respecto al análisis de suspensiones de células por medio de citometría de flujo pueden extraerse, por ejemplo, de Sack U, Tarnok A, Rothe G (ed.): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Basilea, Karger, 2007, páginas 27 - 70.

En la etapa de procedimiento (VII) se aíslan entonces los genes que codifican una enzima dependiente de NADP(H) en las células identificadas y eventualmente se analizan, aislándose por ejemplo los plásmidos que llevan enzimas de las células separadas e identificándose y verificándose sus mutaciones, que conducen a fluorescencia modificada, mediante secuenciación.

A la solución de los objetivos mencionados anteriormente contribuye también el uso del nanodetector de NADP(H), tal como se ha descrito anteriormente en relación con la célula de acuerdo con la invención, para la identificación de genes, que codifican una enzima dependiente de NADP(H).

La invención se explica en más detalle ahora por medio de figuras y ejemplos no limitativos.

Muestra la figura 1 el modo de funcionamiento del nanodetector de NADP(H) en el ejemplo de la forma de realización especialmente preferente descrita anteriormente.

Muestra la figura 2 la fluorescencia específica de las células BL21(DE3) de *E. coli* preparadas en el ejemplo 3 con el nanodetector de NADP(H) (pSensox) y alcohol deshidrogenasa expresada (Lbadh) (cuadrados cerrados). La fluorescencia del nanodetector pSennegK con alcohol deshidrogenasa inactiva se muestra como control (cuadrados abiertos).

Muestra la figura 3 esquemáticamente la formación de la proteína de autofluorescencia como fusión transcripcional (arriba) y traduccional (abajo).

De acuerdo con la figura 1 puede comprender el nanodetector de NADP(H) el gen de *E. coli* para SoxR (soxR), la región intergénica que sigue a esto de *E. coli*, que está localizada entre soxR y soxS y que comprende la secuencia de unión a SoxR y la secuencia de promotor de soxS que sigue a la secuencia de unión a SoxR, una secuencia parcial que sigue a esto del gen soxS de *E. coli* (soxS') así como una secuencia de ácido nucleico que sigue a esto, que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de soxS, que codifica una proteína de autofluorescencia (AFP). En caso de alta concentración de NADP(H) citosólica (izquierda arriba en la figura 1) se encuentran las agrupaciones de [2Fe-2S] (rombos) reducidas por SoxR unido al promotor. En caso de baja disponibilidad de NADPH (derecha arriba en la figura 1) están oxidadas las agrupaciones de [2Fe-2S], y la torsión resultante de la región de promotor de soxS permite a la ARN-polimerasa la iniciación de la transcripción del gen diana. El gen diana soxS nativo está fusionado de acuerdo con la invención con una proteína de autofluorescencia (AFP). Las enzimas dependientes de NADP(H) producen mediante consumo de NADP(H) una expresión reforzada de soxS'-AFP y con ello una fluorescencia reforzada de células como consecuencia del aumento del consumo de NADP(H).

La figura 3 muestra arriba la fusión transcripcional y abajo la fusión traduccional. En ambos casos se forma un transcrito mediante el promotor P1, que es el promotor de soxS controlado por SoxR. Mientras que en la fusión transcripcional se forman dos péptidos separados mediante un segundo sitio de unión a ribosoma (RBS), en el caso de la fusión traduccional se forma un único péptido, la proteína de fusión, en el que la proteína de autofluorescencia contiene secuencias de aminoácidos adicionales.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción del nanodetector de NADPH (fusión transcripcional)

Con los pares de cebadores SoxS_for_SphI (SEQ.-ID.-Nr. 04) y SoxR_rev_SalI (SEQ.-ID.-Nr. 05) así como ADN cromosómico de *E. coli* DH5α como molde se amplificó el gen soxR junto con la región intergénica de soxR-soxS y los primeros 63 nucleótidos de soxS.

SoxS_for_SphI:
ATCTGCATGCTTACGGCTGGTCAATATGCTCGTC

SoxR_rev_SalI:
GCTAGTCGACCAAACTAAAGCGCCCTTGTG

Con los pares de cebadores EYFP_for_SphI (SEQ.-ID.-Nr. 06) y EYFP_rev_ClaI (SEQ.-ID.-Nr. 07) así como el vector pSenLys como molde se amplificó el gen eyfp junto con un sitio de unión a ribosoma. El vector pSenLys se ha descrito en la solicitud de patente WO-A-2011/138006.

EYFP_for_SphI:
AGAGGCATGCAAGGAGAATTACATGGTGAGCAAGGGCGAGG

EYFP_rev_ClaI:
GCGCATCGATTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATG

El vector pBtacLbadh codifica la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Lactobacillus brevis* (Lbadh). Éste se ha descrito por Ernst *et al.* (Ernst M, Kaup B, Müller M, Bringer-Meyer S, Sahm H, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005, 66(6), páginas 629-34). El vector pBtacLbadh se trató con las enzimas de restricción SalI y ClaI, y se aisló el fragmento de vector de ~ 5,0 kb de tamaño del gel de agarosa y se trató con fosfatasa alcalina y se purificó con el kit de extracción en gel QIAquick (n.º de catálogo 28704) de la empresa Quiagen (Hilden, Alemania).

A continuación se ligaron los dos productos de PCR y el vector conjuntamente por medio de T4-ADN-ligasa de New England BioLabs (New England Biolabs, 240 County Road, Ipswich, MA 01938-2723). La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5α. La selección de células que llevan plásmido se realizó mediante colocación en placa de la mezcla de transformación en agar LB (Sambrook *et al.*: "Molecular cloning: a laboratory manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se había complementado con 50 mg/l de ampicilina. El ADN de plásmido se aisló de un transformado, mediante tratamiento con la enzima de restricción BamHI se comprobó con posterior electroforesis en gel de agarosa. El plásmido se denominó pSenSox y está depositado como secuencia SEQ.-ID.-Nr. 08.

Como derivado con alcohol deshidrogenasa modificada, Lbadh, se creó pSennegK. Para ello se amplificó con los cebadores ADH_negK_for (SEQ.-ID.-Nr. 09) y ADH_negK_rev (SEQ.-ID.-Nr. 10) y a su vez pBtacLbadh como molde una Lbadh inactiva con una alcohol deshidrogenasa delecionada en 221 pb. El fragmento resultante se ligó como con el fragmento de vector de ~ 5,7 kb de tamaño que contenía gen eyfp junto con un sitio de unión a ribosoma. La secuencia del vector resultante está depositada como SEQ.-ID.-Nr. 11.

ADH_negK_for:
ACAAGAATTCGCTAAGAGTGTCGGCACTCC

ADH_negK_rev:
GGCCAAGCTTCCGAAGAAGACACCATCAAG

Como otro derivado con alcohol deshidrogenasa modificada, Lbadh, se creó pSen-L194S. Para ello se amplificó con los cebadores L194S_for (SEQ.-ID.-Nr. 12) y L194S_rev (SEQ.-ID.-Nr. 13) pSenSox como molde para la introducción dirigida de la mutación. El plásmido generado se verificó por medio de secuenciación. La secuencia del vector resultante está depositada como SEQ.-ID.-Nr. 14.

L194S_for:
CTGGCTACATCAAGACACCATCTGTTGATG

L194S_rev:
CGGCCCCTGGTAGGTCATCAACAGATGGTG

Como otro derivado con alcohol deshidrogenasa modificada, Lbadh, se creó pSen-L194A. Para ello se amplificó con los cebadores L194A_for (SEQ.-ID.-Nr. 15) y L194A_rev (SEQ.-ID.-Nr. 16) pSenSox como molde para la introducción dirigida de la mutación. El plásmido generado se verificó por medio de secuenciación. La secuencia del vector resultante está depositada como SEQ.-ID.-Nr. 17.

L194A_for:
CTGGCTACATCAAGACACCAGCGGTTGATG

L194A_rev:
CGGCCCCTGGTAGGTCATCAACCGCTGGTG

Ejemplo 2

Uso del nanodetector de NADP(H) para el seguimiento de la formación de productos dependiente de alcohol deshidrogenasa

Con el plásmido pSenSox se transformó BL21(DE3) de *E. coli* (Life Technologies GmbH, Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt). Con una colonia individual se inocularon 5 ml de 2 x medio YT (16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl) y se incubó el cultivo durante la noche a 37 ºC y 130 rpm. Con este cultivo previo se inoculó el cultivo principal para obtener una DO de 0,05 en 50 ml de 2 x TY, que se incubó a 37 ºC y 130 rpm. Con la DO de 0,3 se añadió IPTG 1 mM y el cultivo se incubó durante otras 3 horas hasta obtener una DO de 5-6.

A continuación se añadieron en cada caso 0,9 ml de la suspensión celular en un recipiente de reacción de la placa de microtitulación Flowerplate (48 pocillos) del sistema de cultivo BioLector (m2plabs GmbH, Aachen, Alemania). A la suspensión celular se añadió acetoacetato de metilo (MAA) en concentración creciente en un volumen constante de 0,1 ml. A continuación se incubó la placa de microtitulación Flowerplate a 30 ºC, 1200 rpm, radio de agitación de 3 mm. En el sistema de cultivo BioLector se registró en línea el crecimiento como luz dispersa en 620 nm, así como se registró de manera continua la fluorescencia del cultivo con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia específica tras 10 horas se representó gráficamente con respecto a la cantidad de MAA añadido, y está representada en la figura 2 (se añadieron 0 - 70 mM de acetoacetato de metilo a mezclas de reacción individuales y tras 10 horas se determinó la fluorescencia específica que está indicada como cuadrados rellenos de negro; como control negativo (cuadrados vacíos) sirvió BL21(DE3) pSennegK de *E. coli* con Lbadh inactiva.). La figura 2 muestra un aumento de la fluorescencia con concentración creciente de MAA. Este aumento está condicionado por pSenSox, dado que una reacción control con el plásmido pSennegK con alcohol deshidrogenasa inactiva, que sin embargo es por lo demás idéntico a pSenSox, no produce ningún aumento de la fluorescencia.

Ejemplo 3

Uso del nanodetector de NADP(H) para la determinación de distintas actividades alcohol deshidrogenasa

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Life Technologies GmbH, Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt) se transformó en cada caso con pSennegK, pSen-L194S, y pSen-L194A. Adicionalmente se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pSenSox descrita en el ejemplo 2 con pET28a como segundo plásmido. El vector mencionado en último lugar se adquirió de Novagen (Life Technologies GmbH, Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt). Con una colonia individual de la respectiva cepa se inocularon 5 ml de 2 x medio YT (16 g/l triptona, 10 g/l de extracto de lavadura, 5 g/l de NaCl) y se incubó el cultivo durante la noche a 37 ºC y 130 rpm. Con este cultivo previo se inoculó el cultivo principal para obtener una DO de 0,05 en 50 ml de 2 x TY, que se incubó a 37 ºC y 130 rpm. En el caso de DO de 0,3 no se añadió IPTG, o bien a la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pSenSox se añadió IPTG 1 mM y se incubó el cultivo durante otras 3 horas hasta obtener una DO de 5-6.

A continuación se añadieron, tal como se ha descrito en el ejemplo 2, en cada caso 0,9 ml de las células en cada caso en un recipiente de reacción de la placa de microtitulación Flowerplate (48 pocillos) del sistema de cultivo BioLector (m2plabs GmbH, Aachen, Alemania). A la suspensión celular se añadió en cada caso, en 0,1 ml, acetoacetato de metilo (MAA) para obtener una concentración final de 40 mM. A continuación se incubó la placa de microtitulación Flowerplate a 30 ºC, 1200 rpm, radio de agitación de 3 mm, y se determinó la fluorescencia específica. La fluorescencia específica obtenida tras 19 horas está indicada en la tabla 1.

Adicionalmente se determinó la actividad alcohol deshidrogenasa de las células *E. coli* recombinantes en las mezclas de reacción individuales. Para ello se recogieron las células a 10.000 x g, 4 ºC, durante 5 min y se suspendieron en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,5, ditiotreitol 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM. Las células se homogeneizaron por medio de Silamat S5 (Ivoclar Vivadent GmbH, Alemania) con ayuda de esferas de vidrio con 0,1 mm de diámetro. El extracto bruto que se obtuvo tras centrifugación a 16.000 x g, 4 ºC, durante 20 min se usó en el ensayo de enzima para la cuantificación de la actividad alcohol deshidrogenasa. El ensayo contenía acetoacetato de metilo 5 mM, NADPH 0,25 mM y $MgCl_2$ 1 mM en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,5, y 0,01-0,1 ml de extracto bruto. La reducción de NADP(H) se siguió a 340 nm y 30 ºC. Una unidad enzimática (U) está indicada como aquella cantidad de extracto bruto que reduce 0,001 mmol de NADP(H) por minuto. Ésta está mencionada igualmente en la tabla 1.

Ejemplo 4

Aislamiento de alcohol deshidrogenasa mutada con reconocimiento de sustrato modificado

La alcohol deshidrogenasa Lbadh de *Lactococcus lactis* tiene alta actividad con acetoacetato de metilo, sin embargo sólo una baja actividad de aproximadamente el 10 % con 4-metil-2-pentanona como sustrato. Para desarrollar una Lbadh con actividad más alta, se introdujeron en pSenSox mutaciones aleatorias mediante error-prone PCR (epPCR). Para la introducción de las mutaciones se usaron 10 ng de pSenSox como molde por reacción, así como Mn^{2+} 0,1 - 0,8 mM, ajustándose en el caso de concentraciones más bajas inferiores a < Mn^{2+} 0,2 mM con Mg^{2+}, una concentración total de al menos 0,2 mM. Por reacción se añadieron 0,5 µl de Taq-polimerasa de Fermentas (n.º de catálogo EP0401). Como cebadores se usaron los polinucleótidos

SEQ.-ID.-Nr. 18:
ACAAGAATTCGCTAAGAGTGTCGGCACTCC

SEQ.-ID.-Nr. 19:
GGCCAAGCTTCCGAAGAAGACACCATCAAG.

Las reacciones se incubaron durante 30 minutos. A continuación se trataron los productos de reacción con BamHI y SalI, y se ligaron con el vector pSenSox igualmente tratado previamente.

Con los productos de ligación se transformó DH5amer de *E. coli* (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87, páginas 4645-4649). Tras la incubación durante 30 h se arrastraron los transformados con 10 ml de 2 x YT de las placas y se diluyeron diez veces en 2 x medio YT fresco. Tras incubación durante 4 horas a 37 ºC se añadió 4-metil-2-pentanona 20 mM como sustrato y tras incubación de otras tres horas se alimentó al análisis FACS y clasificación.

Para el análisis FACS y clasificación de las células con alta fluorescencia se ajustó la suspensión celular en 2 x medio YT hasta una densidad óptica inferior a 0,1, e inmediatamente se alimentó al FACS ARIA II high-speed cell sorter (BectonDickinson GmbH, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg). El análisis se realizó con las longitudes de onda de excitación de 488 y 633 nm y la detección con las longitudes de onda de emisión de 530 ± 15 nm y 660 ± 10 nm con una presión de muestra de 70 psi. Los datos se analizaron con la versión de software BD DIVA 6.1.3 que pertenece al aparato. Como líquido de revestimiento se usó BD FACSflow. La activación electrónica se ajustó por medio de la dispersión directa y de retroceso, para excluir partículas no bacterianas. Para clasificar células positivas para EYFP, se selecciona la siguiente etapa de la activación electrónica para excluir células no fluorescentes. De esta manera se clasifican 123 células fluorescentes por caja Petri, que contiene 2 x medio YT.

Con las colonias obtenidas tras la incubación durante 30 horas a 37 ºC se inocularon, tal como se ha descrito en el ejemplo 2, recipientes de reacción de la placa de microtitulación Flowerplate (48 pocillos) del sistema de cultivo BioLector (m2plabs GmbH, Aachen, Alemania). Como sustrato se usó sin embargo no acetoacetato de metilo, sino 4-metil-2-pentanona 20 mM. Tras 120 minutos se cuantificó la fluorescencia específica y se seleccionó un clon cuya actividad alcohol deshidrogenasa se determinó en el ensayo de enzima, tal como se ha descrito en el ejemplo 3. Como sustrato se usó a este respecto 4-metil-2-pentanona 20 mM.

El mutante así obtenido con el plásmido pSen-A93M tiene una actividad específica aumentada en un 26 % en comparación con la cepa de partida (tabla 2), así como una velocidad de conversión elevada en un 37 % con 4-metil-2-pentanona como sustrato. La secuencia del plásmido pSen-A93M está depositada como SEQ.-ID.-Nr. 20.

Tabla 1: correlación de la actividad alcohol deshidrogenasa de células completas con la fluorescencia específica

Cepa	IPTG	Actividad alcohol deshidrogenasa (U mg^{-1})	Fluorescencia específica
BL21(DE3) pSennegK	-	0,03 ± 0,01	0,06
BL21(DE3) pSenSox, pET28a	-	0,5 ± 0,1	0,09
BL21(DE3) pSenL194S	-	0,7 ± 0,3	0,11
BL21(DE3) pSenL194A	-	2,7 ± 0,6	0,17
BL21(DE3) pSenSox	-	6,2 ± 0,6	0,38
BL21(DE3) pSenSox	+	15,2 ± 2,0	0,45

Tabla 2: aumento de la actividad y la velocidad de conversión de la alcohol deshidrogenasa aislada por medio de nanodetector de NADP(H) y FACS con 4-metil-2-pentanona como sustrato.

Cepa	Actividad alcohol deshidrogenasa (U mg^{-1})	$v_{máx}$ (U mg^{-1})	K_M (mM)
DH5α pSensox	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,02	0,10 ± 0,01
DH5α pSenA93M	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,03	0,88 ± 0,03

Ejemplo 5

Construcción del nanodetector de NADPH (fusión traduccional)

Con los pares de cebadores SoxS_for_SphI t1 (SEQ.-ID.-Nr. 21) y SoxR_rev_SalI_t1 (SEQ.-ID.-Nr. 22) así como ADN cromosómico de DH5α de *E. coli* como molde se amplificó el gen soxR junto con la región intergénica de soxR-soxS y los primeros 63 nucleótidos de soxS.

SoxS_for_SphI_t1:
ATCTGCATGCCGGCTGGTCAATATGCTCGTC

SoxR_rev_SalI_t1:
GCTAGTCGACCAAACTAAAGCGCCCTTGTG

Con los pares de cebadores EYFP_for_SphI_t1 (SEQ.-ID.-Nr. 23) y EYFP_rev_ClaI_t1 (SEQ.-ID.-Nr. 24) así como el vector pSenLys como molde se amplificó el gen eyfp. El vector pSenLys está descrito en la solicitud de patente WO-A-2011/138006.

EYFP_for_SphI_t1:
AGAGGCATGCGTGAGCAAGGGCGAGG
EYFP_rev_ClaI_t1:
GCGCATCGATTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATG

El vector pBtacLbadh codifica la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Lactobacillus brevis* (Lbadh). Éste se ha descrito por Ernst *et al.* (Ernst M, Kaup B, Müller M, Bringer-Meyer S, Sahm H, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005, 66(6), páginas 629-34). El vector pBtacLbadh se trató con las enzimas de restricción SalI y ClaI, y se aisló el fragmento de vector de ~ 5,0 kb de tamaño del gel de agarosa y se trató con fosfatasa alcalina y se purificó con el kit de extracción en gel QIAquick (n.º de catálogo 28704) de la empresa Quiagen (Hilden, Alemania).

A continuación se ligaron los dos productos de PCR y el vector conjuntamente por medio de T4-ADN-ligasa de New England BioLabs (New England Biolabs, 240 County Road, Ipswich, MA 01938-2723). La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5α. La selección de células que llevan plásmido se realizó mediante colocación en placa de la mezcla de transformación en agar LB (Sambrook *et al.*: "Molecular cloning: a laboratory manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se había complementado con 50 mg/l de ampicilina. El ADN de plásmido se aisló de un transformado, mediante tratamiento con la enzima de restricción BamHI se comprobó con posterior electroforesis en gel de agarosa. El plásmido se denominó pSenSox_t1 y está depositado como secuencia SEQ.-ID.-Nr. 25.

SECUENCIAS

SEQ.-ID.-NR. 01

```
aaatctgcct cttttcagtg ttcagttcgt taattcatct gttggggagt ataattcctc     60
aagttaactt gaggtaaagc gattt                                           85
```

SEQ.-ID.-NR. 02

```
atggaaaaga aattaccccg cattaaagcg ctgctaaccc ccggcgaagt ggcgaaacgc     60
agcggtgtgg cggtatcggc gctgcatttc tatgaaagta aagggttgat taccagtatc    120
cgtaacagcg gcaatcagcg gcgatataaa cgtgatgtgt tgcgatatgt tgcaattatc    180
aaaattgctc agcgtattgg cattccgctg gcgaccattg gtgaagcgtt tggcgtgttg    240
cccgaagggc atacgttaag tgcgaaagag tggaaacagc tttcgtccca atggcgagaa    300
gagttggatc ggcgcattca taccttagtg gcgctgcgtg acgaactgga cggatgtatt    360
ggttgtggct gcctttcgcg cagtgattgc ccgttgcgta acccgggcga ccgcttagga    420
gaagaaggta ccggcgcacg cttgctggaa gatgaacaaa actaa                    465
```

SEQ.-ID.-NR. 03

```
MEKKLPRIKA LLTPGEVAKR SGVAVSALHF YESKGLITSI RNSGNQRRYK RDVLRYVAII     60
KIAQRIGIPL ATIGEAFGVL PEGHTLSAKE WKQLSSQWRE ELDRRIHTLV ALRDELDGCI    120
GCGCLSRSDC PLRNPGDRLG EEGTGARLLE DEQN                                154
```

SEQ.-ID.-NR. 04
atctgcatgc ttacggctgg tcaatatgct cgtc 34

SEQ.-ID.-NR. 05
gctagtcgac caaactaaag cgcccttgtg 30

SEQ.-ID.-NR. 06
agaggcatgc aaggagaatt acatggtgag caagggcgag g 41

SEQ.-ID.-NR. 07
gcgcatcgat ttattacttg tacagctcgt ccatg 35

SEQ.-ID.-NR. 08

```
ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc     60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg    120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt    180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa    240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc    300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc    360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc    420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct    480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac    540
```

gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccattggt tgatgaccta 600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa 660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg 720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg 780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa 840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag 900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact 960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt 1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt 1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa 1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt 1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 1320
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2340
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2460
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540
agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600
tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660
cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720
atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440

```
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc    4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac    4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt    4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc    4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc    4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag    4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc    4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc    4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc    4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg    5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt    5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg    5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct    5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat    5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa    5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc    5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa    5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa    5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac    5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac    5640
cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt    5700
cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga    5760
cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat    5820
cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta    5880
caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt    5940
gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca    6000
gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta    6060
ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt    6120
cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc    6180
ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg    6240
tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc    6300
gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga    6360
gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt    6420
cacacaggaa acagaa                                                    6436
```

SEQ.-ID.-NR. 09
acaagaattc gctaagagtg tcggcactcc 30

SEQ.-ID.-NR. 10
ggccaagctt ccgaagaaga caccatcaag 30

SEQ.-ID.-NR. 11

```
agcttctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc      60
agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct ggcggcagta gcgcggtggt cccacctgac     120
cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgccgatg gtagtgtggg gtctccccat     180
gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc     240
ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg     300
agcggatttg aacgttgcga agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata     360
aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct     420
acaaactctt ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat     480
aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc     540
gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa     600
cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac     660
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga     720
tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtgttgac gccgggcaag     780
agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca     840
cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca     900
tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa     960
```

```
ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc    1020
tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa    1080
cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag    1140
actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct    1200
ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac    1260
tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa    1320
ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt    1380
aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat    1440
ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg    1500
agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc    1560
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg    1620
tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag    1680
cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact    1740
ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg    1800
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc    1860
ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg    1920
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg    1980
cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag    2040
ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc    2100
gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct    2160
ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc    2220
ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc    2280
gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcctg atgcggtatt    2340
ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct    2400
gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat    2460
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc    2520
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc    2580
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag    2640
cgattcacag atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt    2700
taatgtctgg cttctgataa agcgggccat gttaagggcg gttttttcct gtttggtcac    2760
ttgatgcctc cgtgtaaggg ggaatttctg ttcatggggg taatgatacc gatgaaacga    2820
gagaggatgc tcacgatacg ggttactgat gatgaacatg cccggttact ggaacgttgt    2880
gagggtaaac aactggcggt atggatgcgg cgggaccaga gaaaaatcac tcagggtcaa    2940
tgccagcgct tcgttaatac agatgtaggt gttccacagg gtagccagca gcatcctgcg    3000
atgcagatcc ggaacataat ggtgcagggc gctgacttcc gcgtttccag actttacgaa    3060
acacggaaac cgaagaccat tcatgttgtt gctcaggtcg cagacgtttt gcagcagcag    3120
tcgcttcacg ttcgctcgcg tatcggtgat tcattctgct aaccagtaag gcaaccccgc    3180
cagcctagcc gggtcctcaa cgacaggagc acgatcatgc gcacccgtgg ccaggaccca    3240
acgctgcccg agatgcgccg cgtgcggctg ctggagatgg cggacgcgat ggatatgttc    3300
tgccaagggt tggtttgcgc attcacagtt ctccgcaaga attgattggc tccaattctt    3360
ggagtggtga atccgttagc gaggtgccgc cggcttccat tcaggtcgag gtggcccggc    3420
tccatgcacc gcgacgcaac gcggggaggc agacaaggta tagggcggcg cctacaatcc    3480
atgccaaccc gttccatgtg ctcgccgagg cggcataaat cgccgtgacg atcagcggtc    3540
cagtgatcga agttaggctg gtaagagccg cgagcgatcc ttgaagctgt ccctgatggt    3600
cgtcatctac ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccggaag    3660
cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgcgt cgcgaacgcc agcaagacgt    3720
agcccagcgc gtcggccgcc atgccggcga taatggcctg cttctcgccg aaacgtttgg    3780
tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa gattccgaat accgcaagcg    3840
acaggccgat catcgtcgcg ctccagcgaa agcggtcctc gccgaaaatg acccagagcg    3900
ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac agtcataagt gcggcgacga    3960
tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc tgactgggtt gaaggctctc aagggcatcg    4020
gtcgaccaaa ctaaagcgcc cttgtggcgc tttagttttg ttcatcttcc agcaagcgtg    4080
cgccggtacc ttcttctcct aagcggtcgc ccgggttacg caacgggcaa tcactgcgcg    4140
aaaggcagcc acaaccaata catccgtcca gttcgtcacg cagcgccact aaggtatgaa    4200
tgcgccgatc caactcttct cgccattggg acgaaagctg tttccactct ttcgcactta    4260
acgtatgccc ttcgggcaac acgccaaacg cttcaccaat ggtcgccagc ggaatgccaa    4320
tacgctgagc aattttgata attgcaacat atcgcaacac atcacgttta tatcgccgct    4380
gattgccgct gttacggata ctggtaatca acccttttact ttcatagaaa tgcagcgccg    4440
ataccgccac accgctgcgt ttcgccactt cgccgggggt tagcagcgct ttaatgcggg    4500
gtaatttctt ttccataaat cgctttacct caagttaact tgaggaatta tactccccaa    4560
cagatgaatt aacgaactga acactgaaaa gaggcagatt tatgtcccat cagaaaatta    4620
ttcaggatct tatcgcatgg attgacgagc atattgacca gccgtaagca tgcaaggaga    4680
attacatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc ctggtcgagc    4740
tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca    4800
cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc    4860
```

```
ccaccctcgt gaccaccttc ggctacggcc tgcagtgctt cgcccgctac cccgaccaca    4920
tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca    4980
tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca    5040
ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcaacttcaa ggaggacggc aacatcctgg    5100
ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga    5160
agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgagggcggc agcgtgcagc    5220
tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca    5280
accactacct gagctaccag tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca    5340
tggtcctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca    5400
agtaataaat cgatccggag cttatcgact gcacggtgca ccaatgcttc tggcgtcagg    5460
cagccatcgg aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tcactgcata attcgtgtcg    5520
ctcaaggcgc actcccgttc tggataatgt tttttgcgcc gacatcataa cggttctggc    5580
aaatattctg aaatgagctg ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt gtggaattgt    5640
gagcggataa caatttcaca caggaaacag aattcgctaa gagtgtcggc actcctgatc    5700
agattcaatt tttccaacat gattcttccg atgaagacgg ctggacgaaa ttattcgatg    5760
caacggaaaa agcctttggc ccagtttcta cattagttaa taacgctggg atcgcggtta    5820
acaagagtgt cgaagaaacc acgactgctg aatggcgtaa attattagcc gtcaaccttg    5880
atggtgtctt cttcgga                                                   5897
```

SEQ.-ID.-NR. 12
ctggctacat caagacacca tctgttgatg 30

SEQ.-ID.-NR. 13
cggcccctgg taggtcatca acagatggtg 30

SEQ.-ID.-NR. 14

```
ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc      60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg     120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt     180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa     240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc     300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc     360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc     420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct     480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac     540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccatctgt tgatgaccta     600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa     660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg     720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg     780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa     840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag     900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact     960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt    1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt    1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa    1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt    1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct    1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc    1320
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa     1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg    1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt    1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg    1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac    1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc    1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa    1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc    1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt    1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga    1920
```

taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2340
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2460
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540
agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600
tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660
cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720
atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa 5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa 5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac 5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac 5640
cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt 5700
cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5760
cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat 5820

```
cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta      5880
caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt      5940
gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca      6000
gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta      6060
ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt      6120
cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc      6180
ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg      6240
tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc      6300
gttctggata atgtttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga       6360
gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt      6420
cacacaggaa acagaa                                                      6436
```

SEQ.-ID.-NR. 15
ctggctacat caagacacca gcggttgatg 30

SEQ.-ID.-NR. 16
cggcccctgg taggtcatca accgctggtg 30

SEQ.-ID.-NR. 17

```
ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc        60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg       120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt       180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa       240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc       300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc       360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc       420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct       480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac       540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccagcggt tgatgaccta       600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa       660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg       720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg       780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa       840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag       900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact       960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt      1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt      1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa      1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt      1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct      1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc      1320
ctttttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa     1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg      1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt      1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg      1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac      1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc      1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa      1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc      1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt      1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga      1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa      1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa      2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa      2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt      2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt      2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg      2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt      2340
```

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2460
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc 2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540
agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600
tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660
cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720
atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa 5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa 5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac 5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac 5640
cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt 5700
cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5760
cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat 5820
cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5880
caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5940
gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 6000
gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta 6060
ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 6120
cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc 6180
ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 6240
tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 6300
gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 6360
gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 6420
cacacaggaa acagaa 6436

SEQ.-ID.-NR. 18
acaagaattc gctaagagtg tcggcactcc 30

SEQ.-ID.-NR. 19
ggccaagctt ccgaagaaga caccatcaag 30

SEQ.-ID.-NR. 20

```
ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc      60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg     120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt     180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa     240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcatggttaa caagagtgtc     300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc     360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc     420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct     480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac     540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccattggt tgatgaccta     600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa     660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg     720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg     780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa     840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag     900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact     960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt    1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt    1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa    1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt    1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct    1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc    1320
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa    1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg    1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt    1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg    1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac    1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc    1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa    1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc    1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt    1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga    1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa    1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa    2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa    2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt    2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt    2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg    2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt    2340
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca    2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac    2460
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac    2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct    2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg    2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca    2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt    2760
```

```
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta   2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc   2880
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc   2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa   3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag   3060
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct   3120
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata   3180
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac   3240
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga   3300
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa   3360
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct   3420
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg   3480
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta   3540
agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga   3600
tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg   3660
cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta   3720
atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca   3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga   3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct   3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc   3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc   4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt   4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt   4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg   4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca   4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag   4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct   4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat   4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc   4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac   4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt   4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc   4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc   4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag   4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc   4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc   4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc   4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg   5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt   5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg   5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct   5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat   5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa   5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc   5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa   5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa   5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac   5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac   5640
cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt   5700
cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga   5760
cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat   5820
cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta   5880
caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt   5940
gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca   6000
gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta   6060
ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt   6120
cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc   6180
ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg   6240
tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc   6300
gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga   6360
gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt   6420
cacacaggaa acagaa                                                   6436
```

SEQ.-ID.-NR. 21
atctgcatgc cggctggtca atatgctcgt c 31

SEQ.-ID.-NR. 22
gctagtcgac caaactaaag cgcccttgtg 30

SEQ.-ID.-NR. 23
agaggcatgc gtgagcaagg gcgagg 26

SEQ.-ID.-NR. 24
gcgcatcgat ttattacttg tacagctcgt ccatg 35

SEQ.-ID.-NR. 25

```
ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc      60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg     120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt     180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa     240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc     300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc     360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc     420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct     480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac     540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccattggt tgatgaccta     600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa     660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg     720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg     780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa     840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag     900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact     960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt    1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt    1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa    1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt    1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct    1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc    1320
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa    1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg    1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt    1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg    1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac    1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc    1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa    1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc    1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt    1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga    1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa    1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa    2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa    2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt    2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt    2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg    2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt    2340
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca    2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac    2460
```

tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540
agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600
tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660
cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720
atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400
atggattgac gagcatattg accagccggc atgcgtgagc aagggcgagg agctgttcac 5460
cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 5520
gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac 5580
caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accttcggct acggcctgca 5640
gtgcttcgcc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 5700
cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg 5760
cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcaa 5820
cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 5880
cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 5940
caacatcgag ggcggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca cccccatcgg 6000
cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa 6060
agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgcccgggat 6120
cactctcggc atggacgagc tgtacaagta ataaatcgat ccggagctta tcgactgcac 6180
ggtgcaccaa tgcttctggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggtatgg ctgtgcaggt 6240
cgtaaatcac tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc ccgttctgga taatgttttt 6300
tgcgccgaca tcataacggt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca 6360
tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagaa 6418

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> nanodetector de NADP(H)

<130> FJ11448

<160> 25
<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 85
<212> ADN
<213> *E. coli*

<400> 1

```
aaatctgcct cttttcagtg ttcagttcgt taattcatct gttggggagt ataattcctc      60

aagttaactt gaggtaaagc gattt                                            85
```

<210> 2
<211> 465
<212> ADN
<213> *E. coli*

<400> 2

```
atggaaaaga aattaccccg cattaaagcg ctgctaaccc ccggcgaagt ggcgaaacgc      60

agcggtgtgg cggtatcggc gctgcatttc tatgaaagta aagggttgat taccagtatc     120

cgtaacagcg gcaatcagcg gcgatataaa cgtgatgtgt tgcgatatgt tgcaattatc     180

aaaattgctc agcgtattgg cattccgctg gcgaccattg gtgaagcgtt tggcgtgttg     240

cccgaagggc atacgttaag tgcgaaagag tggaaacagc tttcgtccca atggcgagaa     300

gagttggatc ggcgcattca taccttagtg gcgctgcgtg acgaactgga cggatgtatt     360

ggttgtggct gcctttcgcg cagtgattgc ccgttgcgta acccgggcga ccgcttagga     420

gaagaaggta ccggcgcacg cttgctggaa gatgaacaaa actaa                     465
```

<210> 3
<211> 154
<212> PRT
<213> *E. coli*

<400> 3

Met Glu Lys Lys Leu Pro Arg Ile Lys Ala Leu Leu Thr Pro Gly Glu
1 5 10 15

Val Ala Lys Arg Ser Gly Val Ala Val Ser Ala Leu His Phe Tyr Glu
20 25 30

Ser Lys Gly Leu Ile Thr Ser Ile Arg Asn Ser Gly Asn Gln Arg Arg
35 40 45

Tyr Lys Arg Asp Val Leu Arg Tyr Val Ala Ile Ile Lys Ile Ala Gln
50 55 60

Arg Ile Gly Ile Pro Leu Ala Thr Ile Gly Glu Ala Phe Gly Val Leu
65 70 75 80

Pro Glu Gly His Thr Leu Ser Ala Lys Glu Trp Lys Gln Leu Ser Ser
85 90 95

Gln Trp Arg Glu Glu Leu Asp Arg Arg Ile His Thr Leu Val Ala Leu
100 105 110

Arg Asp Glu Leu Asp Gly Cys Ile Gly Cys Gly Cys Leu Ser Arg Ser
115 120 125

Asp Cys Pro Leu Arg Asn Pro Gly Asp Arg Leu Gly Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Gly Ala Arg Leu Leu Glu Asp Glu Gln Asn
145 150

<210> 4
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SoxS_for_SphI

<400> 4
atctgcatgc ttacggctgg tcaatatgct cgtc 34

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SoxR_rev_SalI

<400> 5
gctagtcgac caaactaaag cgcccttgtg 30

<210> 6
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EYFP_for_SphI

<400> 6
agaggcatgc aaggagaatt acatggtgag caagggcgag g 41

<210> 7
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EYFP rev ClaI

<400> 7
gcgcatcgat ttattacttg tacagctcgt ccatg 35

<210> 8
<211> 6436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pSenSox

<400> 8

ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc 60

ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg 120

cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt 180

ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa 240

gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc 300

gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc 360

ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc 420

aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct 480

aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac 540

gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccattggt tgatgaccta 600

ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa 660

cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg 720

ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg 780

gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa 840

aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag 900

aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact 960

gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt 1020

tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt 1080

gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa 1140

attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt 1200

```
attttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct     1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc     1320
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa     1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg     1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt     1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg     1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac     1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc     1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa     1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc     1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt     1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga     1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa     1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa     2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa     2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt     2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt     2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg     2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt     2340
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca     2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac     2460
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac     2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct     2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg     2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca     2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt     2760
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta     2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc     2880
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc     2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa     3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag     3060
```

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120

gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180

gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240

ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300

caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360

cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420

gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480

ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540

agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600

tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660

cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720

atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780

taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840

ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900

cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960

tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020

gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080

gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140

tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200

caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260

tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320

gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380

ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440

ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500

cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560

gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620

cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680

tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740

ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800

cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860

tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920

aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980

ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040

caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100

gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160

gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220

gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280

aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340

ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400

atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa 5460

gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa 5520

cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac 5580

cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac 5640

cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt 5700

cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5760

cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat 5820

cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5880

caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5940

gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 6000

gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta 6060

ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 6120

cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc 6180

ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 6240

tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 6300

gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 6360

gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 6420

cacacaggaa acagaa 6436

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADH_negK_for

<400> 9
acaagaattc gctaagagtg tcggcactcc 30

<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADH_negK_rev

<400> 10
ggccaagctt ccgaagaaga caccatcaag 30

<210> 11
<211> 5897
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector

<400> 11

```
agcttctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc      60
agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct ggcggcagta gcgcggtggt cccacctgac     120
cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgccgatg gtagtgtggg gtctccccat     180
gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc     240
ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg     300
agcggatttg aacgttgcga agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata     360
aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct     420
acaaactctt ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat     480
aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc     540
gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa     600
cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac     660
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga     720
tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtgttgac gccgggcaag     780
agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca     840
cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca     900
tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa     960
ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc    1020
tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa    1080
cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag    1140
actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct    1200
ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac    1260
```

tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa 1320
ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt 1380
aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat 1440
ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg 1500
agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 1560
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg 1620
tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 1680
cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact 1740
ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg 1800
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 1860
ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 1920
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg 1980
cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 2040
ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 2100
gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 2160
ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc 2220
ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc 2280
gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcctg atgcggtatt 2340
ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct 2400
gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg actgggtcat 2460
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 2520
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 2580
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag 2640
cgattcacag atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt 2700
taatgtctgg cttctgataa agcgggccat gttaagggcg gttttttcct gtttggtcac 2760
ttgatgcctc cgtgtaaggg ggaatttctg ttcatggggg taatgatacc gatgaaacga 2820
gagaggatgc tcacgatacg ggttactgat gatgaacatg cccggttact ggaacgttgt 2880
gagggtaaac aactggcggt atggatgcgg cgggaccaga gaaaaatcac tcagggtcaa 2940
tgccagcgct tcgttaatac agatgtaggt gttccacagg gtagccagca gcatcctgcg 3000
atgcagatcc ggaacataat ggtgcagggc gctgacttcc gcgtttccag actttacgaa 3060
acacggaaac cgaagaccat tcatgttgtt gctcaggtcg cagacgtttt gcagcagcag 3120

tcgcttcacg ttcgctcgcg tatcggtgat tcattctgct aaccagtaag gcaaccccgc 3180

cagcctagcc gggtcctcaa cgacaggagc acgatcatgc gcacccgtgg ccaggaccca 3240

acgctgcccg agatgcgccg cgtgcggctg ctggagatgg cggacgcgat ggatatgttc 3300

tgccaagggt tggtttgcgc attcacagtt ctccgcaaga attgattggc tccaattctt 3360

ggagtggtga atccgttagc gaggtgccgc cggcttccat tcaggtcgag gtggcccggc 3420

tccatgcacc gcgacgcaac gcggggaggc agacaaggta tagggcggcg cctacaatcc 3480

atgccaaccc gttccatgtg ctcgccgagg cggcataaat cgccgtgacg atcagcggtc 3540

cagtgatcga agttaggctg gtaagagccg cgagcgatcc ttgaagctgt ccctgatggt 3600

cgtcatctac ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccggaag 3660

cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgcgt cgcgaacgcc agcaagacgt 3720

agcccagcgc gtcggccgcc atgccggcga taatggcctg cttctcgccg aaacgtttgg 3780

tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa gattccgaat accgcaagcg 3840

acaggccgat catcgtcgcg ctccagcgaa agcggtcctc gccgaaaatg acccagagcg 3900

ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac agtcataagt gcggcgacga 3960

tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc tgactgggtt gaaggctctc aagggcatcg 4020

gtcgaccaaa ctaaagcgcc cttgtggcgc tttagttttg ttcatcttcc agcaagcgtg 4080

cgccggtacc ttcttctcct aagcggtcgc ccgggttacg caacgggcaa tcactgcgcg 4140

aaaggcagcc acaaccaata catccgtcca gttcgtcacg cagcgccact aaggtatgaa 4200

tgcgccgatc caactcttct cgccattggg acgaaagctg tttccactct ttcgcactta 4260

acgtatgccc ttcgggcaac acgccaaacg cttcaccaat ggtcgccagc ggaatgccaa 4320

tacgctgagc aattttgata attgcaacat atcgcaacac atcacgttta tatcgccgct 4380

gattgccgct gttacggata ctggtaatca accctttact ttcatagaaa tgcagcgccg 4440

ataccgccac accgctgcgt ttcgccactt cgccgggggt tagcagcgct ttaatgcggg 4500

gtaatttctt ttccataaat cgctttacct caagttaact tgaggaatta tactccccaa 4560

cagatgaatt aacgaactga acactgaaaa gaggcagatt tatgtcccat cagaaaatta 4620

ttcaggatct tatcgcatgg attgacgagc atattgacca gccgtaagca tgcaaggaga 4680

attacatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc ctggtcgagc 4740

tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca 4800

cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc 4860

ccaccctcgt gaccaccttc ggctacggcc tgcagtgctt cgcccgctac cccgaccaca 4920

tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca 4980

tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca 5040

ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcaacttcaa ggaggacggc aacatcctgg 5100

ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga 5160

agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgagggcggc agcgtgcagc 5220

tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca 5280

accactacct gagctaccag tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca 5340

tggtcctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca 5400

agtaataaat cgatccggag cttatcgact gcacggtgca ccaatgcttc tggcgtcagg 5460

cagccatcgg aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tcactgcata attcgtgtcg 5520

ctcaaggcgc actcccgttc tggataatgt tttttgcgcc gacatcataa cggttctggc 5580

aaatattctg aaatgagctg ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt gtggaattgt 5640

gagcggataa caatttcaca caggaaacag aattcgctaa gagtgtcggc actcctgatc 5700

agattcaatt tttccaacat gattcttccg atgaagacgg ctggacgaaa ttattcgatg 5760

caacggaaaa agcctttggc ccagtttcta cattagttaa taacgctggg atcgcggtta 5820

acaagagtgt cgaagaaacc acgactgctg aatggcgtaa attattagcc gtcaaccttg 5880

atggtgtctt cttcgga 5897

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LI 94S_for

<400> 12
ctggctacat caagacacca tctgttgatg 30

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L194S_rev

<400> 13
cggcccctgg taggtcatca acagatggtg 30

<210> 14
<211> 6436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector

<400> 14

ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc 60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg 120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt 180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa 240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc 300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc 360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc 420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct 480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac 540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccatctgt tgatgaccta 600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa 660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg 720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg 780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa 840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag 900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact 960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt 1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt 1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa 1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt 1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 1320
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 1860

aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 1920

taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1980

atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 2040

gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 2100

tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 2160

ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 2220

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 2280

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2340

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2400

agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2460

tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520

atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880

gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2940

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120

gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180

gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240

ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300

caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360

cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420

gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480

ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540

agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600

tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660

cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720

atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa 5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa 5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac 5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac 5640

cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt 5700

cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5760

cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat 5820

cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5880

caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5940

gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 6000

gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta 6060

ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 6120

cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc 6180

ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 6240

tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 6300

gttctggata atgtttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 6360

gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 6420

cacacaggaa acagaa 6436

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L194A_for

<400> 15
ctggctacat caagacacca gcggttgatg 30

<210> 16
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L194A_rev

<400> 16
cggcccctgg taggtcatca accgctggtg 30

<210> 17
<211> 6436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector

<400> 17

ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc 60

ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg 120

cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt 180

ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa 240

gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc 300

gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc 360

ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc 420

aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct 480

aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac 540

gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccagcggt tgatgaccta 600

ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa 660

cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg 720

ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg 780

gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa 840

aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag 900

aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact 960

gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt 1020

tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt 1080

gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa 1140

attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt 1200

atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 1260

tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 1320

ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 1380

agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1440

taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 1500

tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 1560

catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 1620

ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 1680

ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 1740

catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1800

aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 1860

aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 1920

taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1980

atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 2040

gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 2100

tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 2160

ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 2220

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 2280

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2340

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2400

agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2460

tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520

atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880

gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2940

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120

gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180

gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240

ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300

caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360

cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420

gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480

ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540

agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600

tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660

cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720

atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780

taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa 5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa 5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac 5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac 5640
cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt 5700

cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5760

cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat 5820

cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5880

caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5940

gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 6000

gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta 6060

ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 6120

cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc 6180

ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 6240

tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 6300

gttctggata atgtttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 6360

gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 6420

cacacaggaa acagaa 6436

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 18
acaagaattc gctaagagtg tcggcactcc 30

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 19
ggccaagctt ccgaagaaga caccatcaag 30

<210> 20
<211> 6436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector

<400> 20

ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc 60

ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg 120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt 180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa 240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcatggttaa caagagtgtc 300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc 360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc 420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct 480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac 540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccattggt tgatgaccta 600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa 660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg 720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg 780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa 840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag 900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact 960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt 1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt 1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa 1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt 1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 1320
cttttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 1980

atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 2040

gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 2100

tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 2160

ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 2220

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 2280

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2340

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2400

agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2460

tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2520

atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2580

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2640

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2700

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2760

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 2820

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 2880

gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 2940

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3000

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 3060

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 3120

gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3180

gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240

ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300

caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360

cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420

gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480

ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540

agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600

tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660

cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720

atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780

taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840

ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100
gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160
gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220
gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280
aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340
ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400
atggattgac gagcatattg accagccgta agcatgcaag gagaattaca tggtgagcaa 5460
gggcgaggag ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa 5520
cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac 5580
cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac 5640
cttcggctac ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt 5700
cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga 5760

cggcaactac aagacccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat 5820

cgagctgaag ggcatcaact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5880

caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5940

gaacttcaag atccgccaca acatcgaggg cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 6000

gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta 6060

ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 6120

cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaat aaatcgatcc 6180

ggagcttatc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 6240

tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 6300

gttctggata atgtttttg cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 6360

gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 6420

cacacaggaa acagaa 6436

<210> 21
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220
<223> SoxS_for_SphI_t1

<400> 21
atctgcatgc cggctggtca atatgctcgt c 31

<210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SoxR_rev_SalI_t1

<400> 22
gctagtcgac caaactaaag cgcccttgtg 30

<210> 23
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EYFP_for_SphI_t1

<400> 23
agaggcatgc gtgagcaagg gcgagg 26

<210> 24
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220
<223> EYFP_rev_ClaI_t1

<400> 24
gcgcatcgat ttattacttg tacagctcgt ccatg 35

<210> 25
<211> 6418
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pSenSox_t1

<400> 25

```
ttcatgtcta accgtttgga tggtaaggta gcaatcatta caggtggtac gttgggtatc      60
ggtttagcta tcgccacgaa gttcgttgaa gaaggggcta aggtcatgat taccggccgg     120
cacagcgatg ttggtgaaaa agcagctaag agtgtcggca ctcctgatca gattcaattt     180
ttccaacatg attcttccga tgaagacggc tggacgaaat tattcgatgc aacggaaaaa     240
gcctttggcc cagtttctac attagttaat aacgctggga tcgcggttaa caagagtgtc     300
gaagaaacca cgactgctga atggcgtaaa ttattagccg tcaaccttga tggtgtcttc     360
ttcggtaccc gattagggat tcaacggatg aagaacaaag gcttaggggc ttccatcatc     420
aacatgtctt cgatcgaagg ctttgtgggt gatcctagct taggggctta caacgcatct     480
aaaggggccg tacggattat gtccaagtca gctgccttag attgtgccct aaaggactac     540
gatgttcggg taaacactgt tcaccctggc tacatcaaga caccattggt tgatgaccta     600
ccaggggccg aagaagcgat gtcacaacgg accaagacgc caatgggcca tatcggtgaa     660
cctaacgata ttgcctacat ctgtgtttac ttggcttcta acgaatctaa atttgcaacg     720
ggttctgaat ttgtagttga cggtggctac actgctcaat agtaagcttc tgttttggcg     780
gatgagagaa gattttcagc ctgatacaga ttaaatcaga acgcagaagc ggtctgataa     840
aacagaattt gcctggcggc agtagcgcgg tggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag     900
aagtgaaacg ccgtagcgcc gatggtagtg tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact     960
gccaggcatc aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt    1020
tgtttgtcgg tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgggagcgga tttgaacgtt    1080
gcgaagcaac ggcccggagg gtggcgggca ggacgcccgc cataaactgc caggcatcaa    1140
attaagcaga aggccatcct gacggatggc ctttttgcgt ttctacaaac tcttttgttt    1200
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct    1260
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc    1320
```

```
ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa     1380
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg     1440
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt     1500
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg     1560
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac     1620
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc     1680
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa     1740
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc     1800
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt     1860
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga     1920
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa     1980
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa     2040
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa     2100
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt     2160
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt     2220
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg     2280
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt     2340
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca     2400
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac     2460
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac     2520
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct     2580
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg     2640
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca     2700
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt     2760
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta     2820
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc     2880
gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc     2940
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa     3000
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag     3060
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct     3120
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata     3180
```

gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 3240
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 3300
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 3360
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 3420
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 3480
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcacttgatg cctccgtgta 3540
agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg atgctcacga 3600
tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg ttgtgagggt aaacaactgg 3660
cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg tcaatgccag cgcttcgtta 3720
atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag atccggaaca 3780
taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg aaaccgaaga 3840
ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca gcagtcgctt cacgttcgct 3900
cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct agccgggtcc 3960
tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggccagga cccaacgctg cccgagatgc 4020
gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa gggttggttt 4080
gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttggagtg gtgaatccgt 4140
tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg 4200
caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgcctaca atccatgcca acccgttcca 4260
tgtgctcgcc gaggcggcat aaatcgccgt gacgatcagc ggtccagtga tcgaagttag 4320
gctggtaaga gccgcgagcg atccttgaag ctgtccctga tggtcgtcat ctacctgcct 4380
ggacagcatg gcctgcaacg cgggcatccc gatgccgccg gaagcgagaa gaatcataat 4440
ggggaaggcc atccagcctc gcgtcgcgaa cgccagcaag acgtagccca gcgcgtcggc 4500
cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg gaccagtgac 4560
gaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc cgatcatcgt 4620
cgcgctccag cgaaagcggt cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg gcacctgtcc 4680
tacgagttgc atgataaaga agacagtcat aagtgcggcg acgatagtca tgccccgcgc 4740
ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgac caaactaaag 4800
cgcccttgtg gcgctttagt tttgttcatc ttccagcaag cgtgcgccgg taccttcttc 4860
tcctaagcgg tcgcccgggt tacgcaacgg gcaatcactg cgcgaaaggc agccacaacc 4920
aatacatccg tccagttcgt cacgcagcgc cactaaggta tgaatgcgcc gatccaactc 4980
ttctcgccat tgggacgaaa gctgtttcca ctctttcgca cttaacgtat gcccttcggg 5040
caacacgcca aacgcttcac caatggtcgc cagcggaatg ccaatacgct gagcaatttt 5100

gataattgca acatatcgca acacatcacg tttatatcgc cgctgattgc cgctgttacg 5160

gatactggta atcaaccctt tactttcata gaaatgcagc gccgataccg ccacaccgct 5220

gcgtttcgcc acttcgccgg gggttagcag cgctttaatg cggggtaatt tcttttccat 5280

aaatcgcttt acctcaagtt aacttgagga attatactcc ccaacagatg aattaacgaa 5340

ctgaacactg aaaagaggca gatttatgtc ccatcagaaa attattcagg atcttatcgc 5400

atggattgac gagcatattg accagccggc atgcgtgagc aagggcgagg agctgttcac 5460

cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 5520

gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac 5580

caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accttcggct acggcctgca 5640

gtgcttcgcc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 5700

cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg 5760

cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcaa 5820

cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 5880

cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 5940

caacatcgag ggcggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca cccccatcgg 6000

cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa 6060

agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat 6120

cactctcggc atggacgagc tgtacaagta ataaatcgat ccggagctta tcgactgcac 6180

ggtgcaccaa tgcttctggc gtcaggcagc catcggaagc tgtggtatgg ctgtgcaggt 6240

cgtaaatcac tgcataattc gtgtcgctca aggcgcactc ccgttctgga taatgttttt 6300

tgcgccgaca tcataacggt tctggcaaat attctgaaat gagctgttga caattaatca 6360

tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagaa 6418

REIVINDICACIONES

1. Una célula que comprende un nanodetector de NADP(H), en la que el nanodetector de NADP(H) comprende

i) una secuencia de ácido nucleico, a la que puede unirse un regulador, en la que el estado de oxidación del regulador depende de la disponibilidad de NADP(H);
ii) una secuencia de promotor que sigue a la secuencia de ácido nucleico i), a la que puede unirse una ARN-polimerasa, en la que la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor se ve influida por el estado de oxidación del regulador;
iii) una secuencia de ácido nucleico que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor ii), que codifica una proteína de autofluorescencia,

en la que la secuencia de ácido nucleico i) es la secuencia de unión a SoxR, el regulador es el regulador de Sox (SoxR) y la secuencia de promotor es la secuencia de promotor de soxS y
en la que la célula comprende además un plásmido con un gen eventualmente mutado, que codifica una enzima dependiente de NADP(H).

2. Célula según la reivindicación 1, en la que los componentes i) y ii) se forman por la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre soxR y soxS y que comprende la secuencia de unión a SoxR, la secuencia de promotor de soxS que sigue a la secuencia de unión a SoxR y una secuencia que sigue a la secuencia de promotor de soxS, que corresponde en el plano del ARNm a un sitio de unión a ribosoma, o por una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto.

3. Célula según la reivindicación 2, en la que los componentes i) y ii) se forman por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que está constituido por:

a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ.-ID-Nr. 01,
b) una secuencia de ácido nucleico, que presenta una identidad de al menos el 70 % a la secuencia de ácido nucleico de a), pudiéndose unir la secuencia de ácido nucleico a SoxR de manera que la afinidad de la ARN-polimerasa para el promotor de soxS depende del estado de oxidación de SoxR, y
c) una secuencia de ácido nucleico, que puede hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico complementaria según a) o b), pudiéndose unir la secuencia de ácido nucleico a SoxR de manera que la afinidad de la ARN-polimerasa para el promotor de soxS depende del estado de oxidación de SoxR.

4. Célula según una de las reivindicaciones anteriores, en la que el nanodetector de NADP(H) comprende

(α1) el gen de *E. coli* para SoxR (soxR) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;
(α2) la región intergénica de *E. coli* que sigue a (α1), que está localizada entre soxR y soxS y que comprende la secuencia de unión a SoxR, la secuencia de promotor de soxS que sigue a la secuencia de unión a SoxR y una secuencia que sigue a la secuencia de promotor de soxS, que corresponde en el plano del ARNm a un sitio de unión a ribosoma, o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto, como componentes i) y ii);
(α3) eventualmente una secuencia parcial del gen soxS de *E. coli* que sigue a (α2) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;
(α4) una secuencia de ácido nucleico que sigue a (α2) o (α3) y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de soxS, que codifica una proteína de autofluorescencia, como componente iii).

5. Célula según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el nanodetector de NADP(H) comprende

(β1) el gen de *E. coli* para SoxR (soxR) o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;
(β2) la región intergénica de *E. coli* que sigue a (β1), que está localizada entre soxR y soxS y que comprende la secuencia de unión a SoxR, la secuencia de promotor de soxS que sigue a la secuencia de unión a SoxR y una secuencia que sigue a la secuencia de promotor de soxS, que corresponde en el plano del ARNm a un sitio de unión a ribosoma, o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto, tal como se ha definido anteriormente, como componentes i) y ii);
(β3) la secuencia del gen soxS de *E. coli* que sigue a (β2) y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de soxS, una secuencia parcial de este gen o una secuencia de ácido nucleico homóloga a esto;
(β3') otra secuencia que sigue a (β3), que corresponde en el plano de ARNm a un sitio de unión a ribosoma;
(β4) una secuencia de ácido nucleico que sigue a (β3') y que se encuentra bajo el control de la secuencia de promotor de soxS, que codifica una proteína de autofluorescencia, como componente iii).

6. Célula según la reivindicación 4 o 5, en la que el componente (α1) o bien (β1) se selecciona del grupo que está constituido por:

a) una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ.-ID-Nr. 02,

b) una secuencia de ácido nucleico, que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ.-ID-Nr. 03,
c) una secuencia de ácido nucleico, que presenta una identidad de al menos el 70 % a la secuencia de ácido nucleico de a) o b), en la que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido, que puede unirse a la secuencia de unión a SoxR en la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre soxR y soxS, y cuyo estado de oxidación puede influir en la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor localizada igualmente en la región intergénica de *E. coli*,
d) una secuencia de ácido nucleico, que codifica un polipéptido, que presenta una homología de al menos el 70 % a la SEQ.-ID-Nr. 03, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido, que puede unirse a la secuencia de unión a SoxR en la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre soxR y soxS, y cuyo estado de oxidación puede influir en la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor localizada igualmente en la región intergénica de *E. coli*, y
e) una secuencia de ácido nucleico, que puede hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico complementaria según uno de los grupos a) a d), en la que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido, que puede unirse a la secuencia de unión a SoxR en la región intergénica de *E. coli*, que está localizada entre soxR y soxS, y cuyo estado de oxidación puede influir en la afinidad de la ARN-polimerasa para la secuencia de promotor localizada igualmente en la región intergénica de *E. coli*.

7. Célula según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de ácido nucleico (iii), que codifica una proteína de autofluorescencia, se selecciona del grupo que está constituido por los genes que codifican la Green Fluorescent Protein (GFP), la Yellow Fluorescent Protein (YFP), la Blue Fluorescent Protein (BFP), la Cyan Fluorescent Protein (CFP), la enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), la enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP), la enhanced Blue Fluorescent Protein (EBFP), la enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP), DsRed, HcRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, AcGFP y ZsYellow; igualmente puede usarse una proteína fotorreceptora que contiene un denominado dominio LOV.

8. Célula según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula se selecciona del grupo que está constituido por *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* o *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Célula según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la enzima dependiente de NADP(H) se selecciona del grupo que está constituido por alcohol deshidrogenasas, aldehído deshidrogenasas, lactato deshidrogenasas, enoato reductasas, epóxido reductasas, diaminopimelato deshidrogenasas, aminoácido deshidrogenasas, aldehído oxidorreductasas, alcano reductasas, amino reductasas, epóxido deshidrogenasas, ácido carboxílico deshidrogenasas, hidroxiácido cetorreductasas e hidroxiácido deshalogenasas.

10. Un procedimiento para el aislamiento de genes, que codifican enzimas dependientes de NADP(H), que comprende las etapas de procedimiento:

(I) facilitar un nanodetector de NADP(H), tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 7;
(II) introducir el nanodetector de NADP(H) en una célula;
(III) introducir un gen, que codifica eventualmente una enzima dependiente de NADP(H), en células individuales de una suspensión celular de las células obtenidas en la etapa de procedimiento (II);
(IV) incubar las células con un sustrato para la enzima dependiente de NADP(H);
(V) identificar células individuales en la suspensión celular con elevada actividad de enzimas dependientes de NADP(H) mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular;
(VI) separar las células identificadas de la suspensión celular;
(VII) aislar genes que codifican una enzima dependiente de NADP(H) en las células identificadas.

11. Uso de un nanodetector de NADP(H), tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 7, para la identificación *in vivo* de genes que codifican una enzima dependiente de NADP(H).

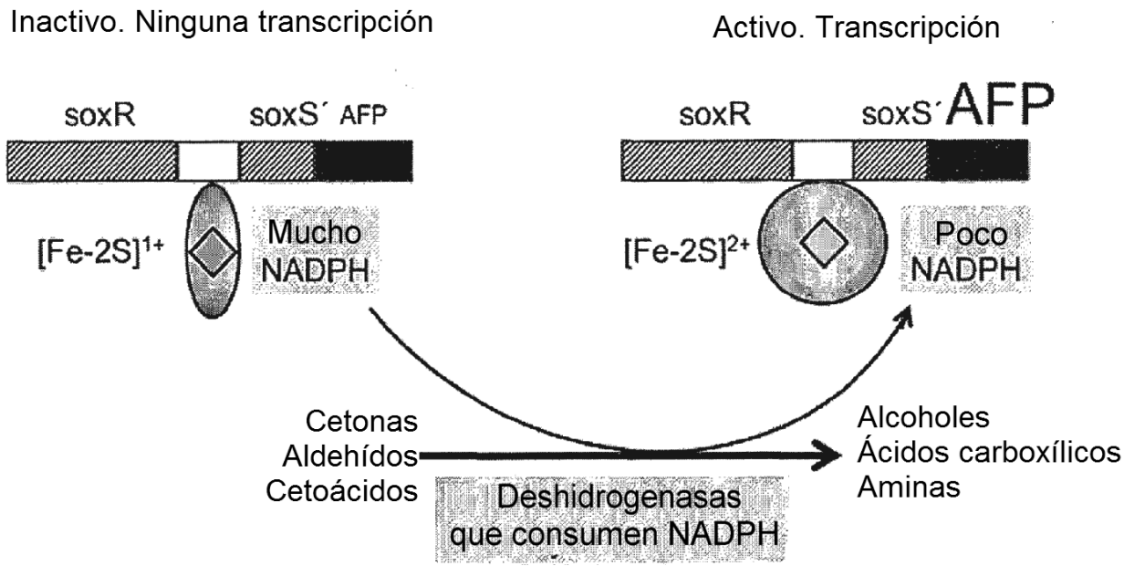
Inactivo. Ninguna transcripción
Activo. Transcripción
soxR
soxS´ AFP
soxR
soxS´AFP
[Fe-2S]1+
Mucho NADPH
[Fe-2S]2+
Poco NADPH
Cetonas
Aldehídos
Cetoácidos
Alcoholes
Ácidos carboxílicos
Aminas
Deshidrogenasas que consumen NADPH

Fig. 1

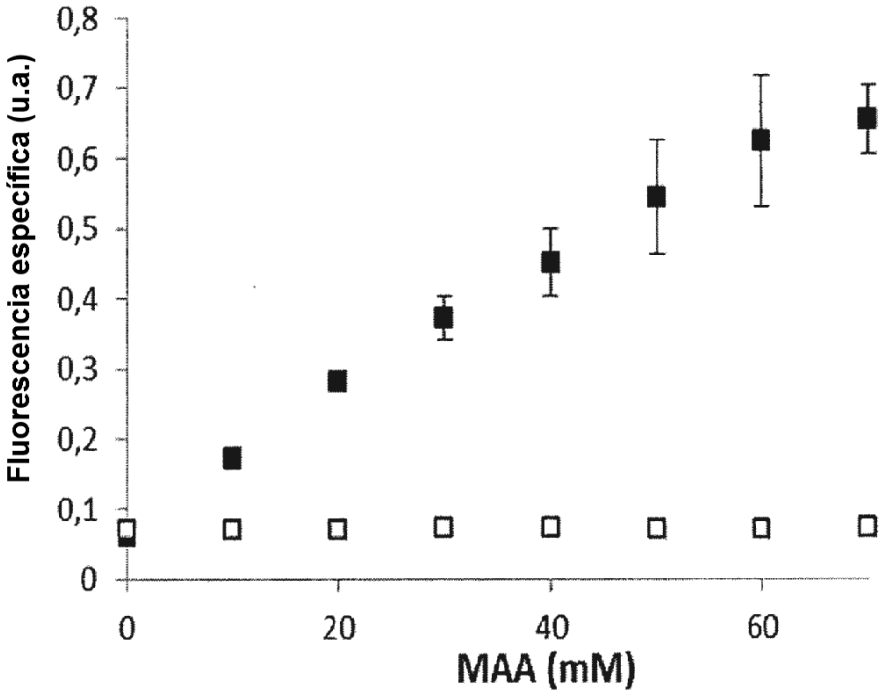
Fluorescencia específica (u.a.)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
20
40
60
MAA (mM)

Fig. 2

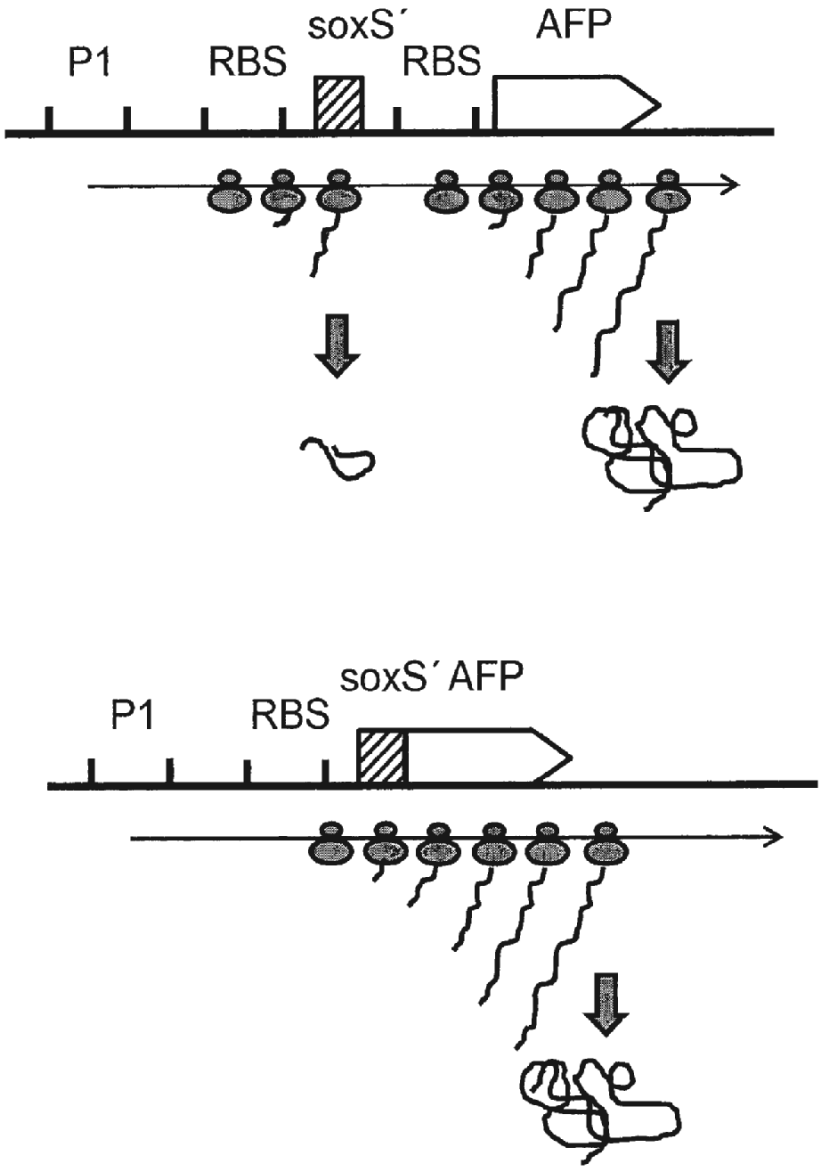

Fig. 3