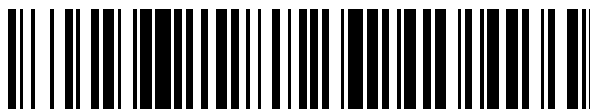


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 303**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012** **PCT/GB2012/052609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013** **WO13057515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012** **E 12781415 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 2768951**

54 Título: **Arsenito oxidasa modificada y un biosensor para detectar arsenito**

30 Prioridad:

19.10.2011 GB 201118026

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2019

73 Titular/es:

THE BIO NANO CENTRE LIMITED (100.0%)
85 Tottenham Court Road
London W17 4TQ, GB

72 Inventor/es:

CASS, ANTHONY EDWARD GEORGE;
SANTINI, JOANNE y
JOHNSON, CHRISTOPHER JAMES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 303 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

Arsenito oxidasa modificada y un biosensor para detectar arsenito

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a enzimas modificadas para detectar la presencia de derivados de arsénico, en particular arsenito, y a métodos para expresar dichas enzimas en organismos heterólogos. La invención también está dirigida a dispositivos para detectar arsénico, y derivados del mismo, en una muestra.

Antecedentes de la invención

10 Se dice que el tercer gran desafío para un futuro sostenible (junto con la seguridad alimentaria y la energía) será hacer un mejor uso de los suministros limitados de agua pura tanto para uso agrícola como consumo humano y para lograr esto será esencial la descontaminación del agua marginal y contaminada. La contaminación de aguas subterráneas ya sea como resultado de procesos geoquímicos naturales o actividades industriales como la minería es un problema importante en muchos países.

15 El arsénico (As) es un contaminante de las aguas subterráneas que está en todas partes en el ambiente y las dos formas solubles, arsenito (As^{III}) y arseniato (As^{V}), son tóxicas. La actividad antropogénica ha dado como resultado una contaminación generalizada de ambas formas solubles, aunque el As^{III} prevalece en ambientes anóxicos que incluyen la mayoría de las fuentes de agua potable. Los países afectados incluyen India, Bangladesh, Vietnam, EE.UU., Alemania, Francia, Hungría, Australia, Argentina, México, Canadá.

20 Un aspecto importante de la descontaminación es la evaluación y monitorización y, mientras existen métodos de laboratorio que demuestran una alta especificidad y sensibilidad (p. ej., ICP-MS o HPLC), también es posible, y de hecho deseable, medir analitos como el arsenito en el campo usando sensores. De manera ideal, los sensores deben ser de bajo costo, desechables y capaces de adaptarse fácilmente a múltiples analitos que comúnmente se encuentran juntos en el agua contaminada.

25 Muchos kits de prueba de campo de As están disponibles comercialmente (p. ej., de Industrial Systems, Inc, Hydrodyne) pero estos solo detectan As total, en lugar de la forma más tóxica, As^{III} , que es dominante en las aguas anóxicas para beber. Además, debido a que la descontaminación elimina de manera preferencial As^{V} (p. ej., mediante la unión al hidróxido de hierro) y requiere la oxidación previa del As^{III} , es crucial determinar si queda algo de As^{III} en el agua. Los kits de arsénico de campo basados en la química se apoyan en un método colorimétrico que reduce el As^{III} y el As^{V} al gas arsina que reacciona con las tiras reactivas de bromuro de mercurio. Estos kits requieren la experiencia del personal, son caros (p. ej., Arsénico, el kit Quick II Hydrodyne, 4,24 \$ EE.UU. por prueba y Ultra Low Quick II, Industrial Test Systems, Inc., 6 \$ EE.UU. por prueba) y tienen baja sensibilidad y reproducibilidad.

30 Se han desarrollado biosensores de células completas para la detección de As^{III} por varios grupos (p. ej., Stocker *et al.* (2003) Environ. Sci. Technol. 37, 4743-4750). Estos métodos están todos basados en ensayos colorimétricos que a veces requieren el uso de un luminómetro. Todos usan el mecanismo de regulación del sistema de resistencia al arsénico de *Escherichia coli* que detecta tanto el As^{III} como la antimonita (Sb^{III}). El gen regulador en este sistema, *arsR*, se fusiona con un gen marcador (p. ej., gen de luciferasa, *luxB*) que cuando se expresa después de la inducción con As^{III} produce una señal visible (p. ej., fluorescencia).

35 Existen muchos problemas con los biosensores de As^{III} basados en células completas, que incluyen: 1) el sistema es demasiado complejo y debido a esto tiene un tiempo de respuesta lento (es decir, el As^{III} debe entrar en las células seguido de la inducción de la proteína del gen regulador-marcador -esto puede tardar hasta 24 horas para una respuesta); 2) falta de especificidad ya que el sistema no discrimina entre As^{III} y Sb^{III} ; 3) a menudo se requieren temperaturas de incubación de 30°C; 4) el ensayo colorimétrico requiere a menudo el uso de un luminómetro, que no es factible en la mayoría de los sitios de campo; y 5) el uso de organismos genéticamente modificados siempre presenta un problema adicional. No se dispone comercialmente de biosensores de células completas para la detección de As^{III} .

45 Se ha desarrollado un biosensor para As^{III} que usa arsenito oxidasa que contiene molibdeno (conocida como "Aio" y también conocida anteriormente como Aro y Aso; véase Lett *et al.*, Unified Nomenclature for Genes Involved in Prokaryotic Aerobic Arsenite Oxidation; J. Bacteriology, 4 Nov 2011; p. 207-208) que es un miembro de la familia de las DMSO reductasas, preparadas a partir de la cepa Alphaproteobacterium quimiolitotrofo NT-26 de *Rhizobium* sp. (Santini *et al.*, (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66, 92-97).

50 La As^{III} oxidasa cataliza la oxidación de As^{III} a As^{V} y se ha probado la idoneidad de esta enzima nativa para usar como un biosensor y ha mostrado detectar por debajo de 1 ppb de As^{III} , que es 10 veces más bajo que el MCL (nivel máximo contaminante) por la OMS de As en agua potable. Además, la enzima nativa muestra especificidad por el As^{III} (Male *et al.* (2007) Anal. Chem. 79, 7831-7837). El biosensor comprende la enzima unida directamente a la superficie de un electrodo modificado con nanotubos de carbono de paredes múltiples, en el que la transferencia de electrones parte directamente desde la enzima al electrodo. Los autores se dieron cuenta, sin embargo, que ciertos materiales de

electrodos comúnmente usados, en particular carbono vítreo (GC), no eran adecuados para la transferencia directa de electrones en esta configuración.

La expresión heteróloga de enzimas que contienen molibdeno, especialmente miembros de la familia de la DMSO reductasa, es notoriamente difícil. Recientemente, la arsenito reductasa desasimilatoria de la cepa de ANA-3 de *Shewanella sp.* se expresó en *Escherichia coli*, aunque no se hicieron comparaciones con la enzima nativa (Malasarn *et al.* (2008) J. Bacteriol. 190, 135-142). La expresión fue óptima cuando se creció *E. coli* anaeróbicamente con DMSO, aunque no se probaron otros aceptores de electrones para el crecimiento anaeróbico y ninguno de ellos fue de diferentes cepas.

Dado que todo el Aio nativo se expresa pobremente en un sistema de expresión heterólogo, como *E. coli*, no está comercialmente disponible el uso de esta enzima en la detección rutinaria de As^{III}.

De esta manera, existe la necesidad de métodos y sensores mejorados para la detección económica y eficaz de As^{III} en líquidos como agua potable, aguas residuales y muestras biológicas.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un microorganismo modificado para expresar una enzima arsenito oxidasa heteróloga modificada para prevenir la translocación al periplasma, en donde la enzima comprende la subunidad AioA nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, y la subunidad AioB nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que conserva al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, en donde se modifica una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la secuencia de translocación, preferiblemente en donde el microorganismo es *E. coli*, preferiblemente en donde el microorganismo es la cepa DH5 α o la JM109 λ pir de *E. coli*.

La presente invención también proporciona un método para producir arsenito oxidasa recombinante, que comprende expresar una arsenito oxidasa modificada en un microorganismo heterólogo, en donde se modifica la enzima arsenito oxidasa para prevenir la translocación al periplasma, en donde la enzima comprende la subunidad AioA nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que conserva al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, y la subunidad AioB nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que conserva al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, en donde se modifica una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la secuencia de translocación.

La presente invención también proporciona un dispositivo para detectar la presencia de arsenito en una muestra, que comprende al menos un electrodo, una enzima arsenito oxidasa y un mediador redox, en donde la enzima comprende la subunidad AioA nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que conserva al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, y la subunidad AioB nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que conserva al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, en donde se modifica una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la secuencia de translocación para prevenir la translocación al periplasma.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la superficie micro-estructurada de un dispositivo de acuerdo con la invención;

La Figura 2 es una curva de dosis-respuesta de As^{III} que muestra los resultados comparables del sensor de la invención durante dos días consecutivos;

La Figura 3 es una comparación de las actividades de la As^{III} oxidasa en extractos celulares totales de cepas DH5 α y JM109 λ pir de *E. coli* crecidas con diferentes aceptores de electrones;

La Figura 4 muestra un gel de poliacrilamida-SDS (12%) de As^{III} oxidasa NT-26 recombinante purificada (M: Marcador de peso molecular: fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), β -lactalbúmina (14 kDa) (GE Healthcare) 1: AioBA recombinante purificada, dos subunidades AioA (~ 94 kDa) AioB con cola de His N-terminal (~ 19 kDa));

Las Figuras 5 (a-j) muestran las mediciones de voltamogramas cíclicos y crono amperometría para un dispositivo de acuerdo con la invención que incluye ferroceno metanol como el mediador;

Las Figuras 6 (a-d) muestran las mediciones de voltamogramas cíclicos para un dispositivo de acuerdo con la invención que incluye Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio(II) como el mediador redox;

Las Figuras 7a y 7b muestran las mediciones de voltamogramas cíclicos y crono amperometría para un dispositivo de acuerdo con la invención que incluye ácido ferroceno carboxílico como el mediador;

Las Figuras 8 (a-f) muestran las mediciones de voltamogramas cíclicos para un dispositivo de acuerdo con la invención que incluye 2,6-diclorofenolindofenol como el mediador redox; y

La Figura 9 muestra voltamogramas cíclicos de TFF como el mediador redox.

Descripción detallada de la invención

5 Los presentes inventores han desarrollado una versión modificada de la As^{III} oxidasa nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 (Número de acceso del GenBank AY345225) que se puede expresar con éxito en sistemas de expresión heteróloga como *E. coli*. Esto se ha logrado modificando una secuencia señal de translocación presente en la enzima nativa, o un fragmento funcional de la misma, para prevenir la translocación.

10 La As^{III} oxidasa consiste en dos subunidades heterólogas: AioB es la subunidad pequeña compuesta en gran parte por láminas beta y AioA es la subunidad grande compuesta en gran parte por alfa-hélices (Santini & vanden Hoven (2004) J. Bacteriology 186(6): 1614-1619). La secuencia polipeptídica salvaje de AioB de *Rhizobium sp.* NT-26 se muestra en la SEQ ID N°. 1 y la SEQ ID N°. 5 muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente. La subunidad AioB comprende una secuencia líder Tat (también denominada en esta memoria de manera intercambiable como una

15 secuencia señal de translocación Tat) que corresponde a los primeros 25 aminoácidos de la SEQ ID N°. 1. Esta secuencia señal de translocación se muestra como SEQ ID N°. 2 y la SEQ ID N°. 6 muestra la secuencia de nucleótidos de la parte del gen *aioB* que codifica la secuencia señal de translocación. La secuencia señal dirige el transporte de la proteína al periplasma usando la vía de Translocación de Arginina Gemela (Tat).

20 Los presentes inventores han modificado la As^{III} oxidasa nativa modificando la secuencia señal de translocación en la subunidad AioB. Como resultado de la modificación, la enzima modificada no se exporta del citoplasma del huésped y, como resultado, se puede expresar en grandes cantidades comercialmente viables.

La secuencia señal de translocación se puede modificar por varios métodos que serán evidentes para un experto en la técnica, que incluyen mutaciones de marco de lectura, mutaciones de sustitución o de supresión. Es adecuada cualquier modificación que de como resultado la pérdida de función de la secuencia señal de translocación nativa, sin embargo, se prefiere la supresión de la secuencia señal de translocación o de un fragmento funcional de la misma.

25 Por consiguiente, la presente descripción proporciona una As^{III} oxidasa modificada para prevenir la translocación mediante la modificación de una secuencia señal de translocación, o un fragmento funcional de la misma.

30 La As^{III} oxidasa modificada comprende dos subunidades. La primera subunidad corresponde a la subunidad AioA nativa de NT-26 o una variante, derivado u homólogo de la misma. La segunda subunidad corresponde a la subunidad AioB nativa de NT-26 o una variante, derivado u homólogo de la misma; sin embargo, se modifica en la enzima de la descripción una parte de la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o a un fragmento funcional de la secuencia señal de translocación. Preferiblemente, se modifica por supresión la parte de la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la misma.

35 De acuerdo con la presente descripción se modifica al menos una parte del gen *aioB* que codifica la secuencia señal de translocación o una parte de este que codifica un fragmento funcional de la secuencia señal de translocación, preferiblemente por supresión.

40 La parte de la secuencia del gen *aioB* que codifica la secuencia señal de translocación se identifica en esta memoria como SEQ ID N°. 6. Ya sea la secuencia completa identificada como SEQ ID N°. 6 o un homólogo de esta secuencia que codifica un fragmento funcional de la secuencia señal de translocación se puede modificar de acuerdo con la descripción. Como resultado de la modificación de la secuencia de nucleótidos, la enzima modificada de la descripción no comprende la secuencia de aminoácidos identificada en esta memoria como SEQ ID N°. 2 o no comprende una parte de esta que se requiere para una secuencia de señal de translocación funcional.

45 Como se usa en esta memoria, el término "fragmento funcional" significa que la parte de la secuencia de nucleótidos que se modifica (p. ej., por supresión) codifica un polipéptido que tiene actividad de secuencia señal de translocación Tat, preferiblemente que tiene al menos la misma actividad del polipéptido mostrado como SEQ ID N°. 2. Como resultado de la modificación, la enzima recombinante de la descripción carece de tal actividad de secuencia señal de translocación Tat.

50 Como se usa en esta memoria, el término "homólogo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de secuencia señal de translocación Tat. Con respecto a la similitud de secuencia, preferiblemente hay al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90% de similitud de secuencia entre SEQ ID N°. 6 y la secuencia del gen *aioB* nativo que se modifica de acuerdo con la descripción. Más preferiblemente hay al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% de similitud de secuencia. Estos términos abarcan también variaciones alélicas de las secuencias.

55 De acuerdo con la presente descripción, la parte del gen *aioB* que se modifica de acuerdo con la descripción comprende o consiste en la secuencia identificada en esta memoria como SEQ ID N°. 6.

La SEQ ID N°. 3 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la subunidad AioB que excluye toda la región líder nativa. La SEQ ID N°. 7 muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente. Si se suprime toda la región líder de AioB entonces la subunidad AioB de la enzima modificada de la descripción corresponderá a la SEQ ID N°. 3. Sin embargo, es posible que una parte de la región líder dentro de la subunidad AioB permanezca sin modificar, siempre que la parte de la región líder que se modifica deje no funcional la parte restante.

La SEQ ID N°. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la subunidad AioA y la SEQ ID N°. 8 muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente.

La As^{III} oxidasa modificada puede comprender homólogos, variantes o derivados de las SEQ ID Nos. 3 y 4.

Los términos “variante”, “homólogo”, “derivado” o “fragmento” como se usa en esta memoria incluye cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, supresión o adición de uno (o más) aminoácidos de o a una secuencia. La variante puede tener una variación de una supresión, inserción o sustitución. La variación puede producir un cambio silencioso y un polipéptido funcionalmente equivalente, o puede dar como resultado una función catalítica u otras características mejoradas de la enzima resultante. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos deliberadas en base a propiedades fisicoquímicas similares como el tamaño, la carga y la hidrofobicidad con el fin de alterar la función catalítica u otras propiedades o características de la enzima.

A menos que el contexto admita lo contrario, las referencias a “AioA” y “AioB” incluyen referencias a tales variantes, homólogos y derivados de las subunidades nativas. El término “homólogo” abarca la identidad con respecto a la estructura y/o función y se usa para referirse a péptidos que comparten niveles de identidad o similitud de secuencia a las SEQ ID Nos. 3 y 4 y retienen al menos la funcionalidad de las secuencias de aminoácidos nativas. Las variantes pueden dar como resultado mejoras en la actividad catalítica u otras propiedades de la enzima resultante. Estos términos también abarcan polipéptidos derivados de aminoácidos que son variaciones alélicas de las secuencias de ácido nucleico aioA y/o aioB (SEQ ID Nos. 7 y 8).

Los niveles de identidad o similitud entre secuencias de aminoácidos se pueden calcular usando métodos conocidos. Los métodos informáticos públicamente disponibles incluyen BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997)), el programa BLASTX disponible en NCBI y el programa GAP de Genetics Computer Group, Madison WI.

Es preferible si hay al menos un 60% de identidad o similitud de secuencia con los péptidos especificados de las SEQ ID Nos. 3 y 4, preferiblemente un 70%, más preferiblemente un 80% y lo más preferiblemente mayor que un 90%, p. ej., al menos un 95% a las secuencias de SEQ ID Nos. 3 y 4. La eliminación de la secuencia líder Tat o un fragmento funcional de la misma para prevenir la exportación al periplasma es una técnica conocida y se ha usado previamente en la producción de enzimas heterodiméricas que contienen molibdeno (Malasarn *et al.*, (2008), J. Bacteriol. 190, 135-142). Sin embargo, la As^{III} oxidasa difiere de otras enzimas que contienen molibdeno en que es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ más grande que contiene cofactores adicionales (es decir, una agrupación 3Fe-4S y una agrupación Rieske 2Fe-2S) no presentes en otras enzimas que contienen molibdeno. Se ha demostrado que la enzima nativa está localizada en el periplasma (Santini *et al.*, (2000), J. Bacteriol. 66, 92-97), dado el tamaño del complejo heterotetramérico ensamblado, por lo tanto, es razonable especular que los dos heterodímeros $\alpha\beta$ formados en el citoplasma se exportan (a través del sistema Tat) al periplasma antes de la formación del complejo heterotetramérico. Por lo tanto, los presentes inventores se sorprendieron al encontrar que después de la eliminación de la secuencia líder Tat, la As^{III} oxidasa modificada podría lograr un ensamblaje completo (tanto el ensamblaje de subunidad como la adición del cofactor) para formar un heterotetrámero en el citoplasma de las diversas cepas de *E. coli*.

Para evitar dudas, las abreviaturas “aio”, “Aio”, “aro”, “Aro”, “aso” y “Aso” se pueden usar de manera intercambiable y todas se refieren a la enzima arsenito oxidasa (gen o proteína). Las diferentes abreviaturas son el resultado de una nomenclatura diferente que se ha usado en la técnica (Lett *et al.*, J. Bacteriol. 4 nov 2011; p. 207-208).

La ventaja de modificar la As^{III} oxidasa nativa de acuerdo con la descripción es que se puede expresar con éxito en sistemas de expresión heteróloga como *E. coli* con altos rendimientos comercialmente viables. Una vez expresada, la enzima se puede usar para detectar la presencia de As^{III}. Por lo tanto, se describe en esta memoria el uso de la enzima arsenito oxidasa modificada como se describe anteriormente como un biosensor para detectar la presencia de As^{III} en una muestra. Se ha encontrado que la enzima modificada de la descripción es igualmente eficaz que la enzima nativa para catalizar la oxidación de As^{III} a arseniato As^V (Warelow & Santini, datos no publicados). La ausencia de la secuencia de translocación no afecta a la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto, la enzima modificada es adecuada para su uso en biosensores para detectar la presencia de As^{III}.

Preferiblemente la muestra es una muestra líquida. La muestra líquida puede ser cualquier tipo de líquido que sea susceptible a la contaminación por As^{III}, que incluye, pero no se limita a, agua subterránea, agua potable, líquidos ambientales como efluentes y aguas residuales de la minería, aguas residuales, muestras biológicas.

Preferiblemente, la enzima modificada de la descripción se puede usar en biosensores basados en laboratorio o, preferiblemente, en biosensores desechables de bajo coste adecuados para uso en el campo (es decir, detectar As^{III} en una muestra en la fuente de la muestra en lugar de en un laboratorio).

La ventaja de utilizar la enzima modificada de acuerdo con la descripción en un biosensor para detectar As^{III} en una muestra es que se puede expresar en cantidades comercialmente viables en una variedad de sistemas de expresión heteróloga, que incluyen, de modo inesperado, cepas huésped que se usan normalmente para clonar más que para la expresión de proteínas.

- 5 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo modificado para expresar la As^{III} oxidasa heteróloga de la descripción. El microorganismo de tipo salvaje se puede seleccionar de una gama de especies que incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*. Preferiblemente, el microorganismo de tipo salvaje es *E. coli*, en particular las cepas DH5 α y la JM109 λ pir K12 de *E. coli*.

- 10 Es sorprendente que se haya encontrado que estas cepas son las más adecuadas para expresar la enzima recombinante de la descripción, ya que generalmente se usan en la técnica para la clonación, en lugar de la expresión de proteínas. Como se detalla en el Ejemplo 1 a continuación, los inventores encontraron que inesperadamente se lograron altos rendimientos usando las cepas DH5 α y la JM109 λ pir de *E. coli* en lugar de las cepas BL21 (deficientes en proteasa) y Origami, que se usan comúnmente para la expresión heteróloga de enzimas recombinantes.

- 15 La cepa DH5 α de *E. coli* es una derivada de la cepa Hoffman-Berling 1100 y se puede comprar en Invitrogen™. Las propiedades de esta cepa se describen en la siguiente nomenclatura estándar:

F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -.

La cepa DH5 α se describe en las siguientes publicaciones: FOCUS (1986) 8: 2, 9; Hanahan, D. (1985) en DNA cloning: A Practical Approach (Glover, D. M., ed.) Vol. 1, p. 109, IRL Press; Grant, S. G. N. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4645-4649 PMID 2162051; y Meselson M. y Yuan R. (1968) Nature 217: 1110 PMID. 4868368.

- 20 La cepa JM109 λ pir de *E. coli* se puede comprar en Promega y tiene las siguientes propiedades de nomenclatura estándar:

endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ Δ M15] hsdR17(rK-mK+).

La cepa se describe en Yanisch-Perron *et al.* (1985) Gene, 33(1): 103-19; y Penfold *et al.* (1992) Gene 118: 145-146.

- 25 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir As^{III} oxidasa recombinante, que comprende expresar la enzima modificada como se describe anteriormente, en un microorganismo heterólogo. De acuerdo con una realización de este aspecto de la invención, se pueden usar nuevos cebadores identificados en esta memoria como SEQ ID N°. 9 y SEQ ID N°. 10 para clonar los genes *aioB* y *aioA* de NT-26 (denominados *aioBA*) en el vector pPROEX Htb disponible comercialmente (Invitrogen). Como se describió anteriormente, el gen *aioB* se modifica para suprimir al menos la parte de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 6) que codifica al menos la parte funcional de la secuencia líder TAT que se muestra en esta memoria como SEQ ID N°. 2.

- 30 Preferiblemente el microorganismo heterólogo es *E. coli* y preferiblemente las cepas DH5 α o la JM109 λ pir de *E. coli*. Los presentes inventores han encontrado que la cepa DH5 α proporciona una expresión óptima de la enzima arsenito oxidasa heteróloga cuando se crece aeróbicamente y JM109 λ pir proporciona una expresión óptima de la enzima heteróloga cuando se crece anaeróbicamente con nitrato como aceptor de electrones. Además, los inventores han encontrado que el uso de una cola de afinidad en el extremo N terminal de AioB permite una purificación simple. Esta realización se describe con más detalle en el Ejemplo 1 a continuación.

- 35 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar la presencia de As^{III} en una muestra. El dispositivo comprende un electrodo (denominado "electrodo de prueba") que incorpora una enzima As^{III} oxidasa y un mediador redox.

- 40 El dispositivo puede comprender As^{III} oxidasa de tipo salvaje o la As^{III} oxidasa modificada de acuerdo con la descripción. Preferiblemente, la enzima es la As^{III} oxidasa modificada. Como se discutió anteriormente, se pueden obtener altos rendimientos de la enzima modificada a través de la expresión heteróloga en *E. coli*. Por lo tanto, es preferible usar la enzima modificada para mantener bajos los costes de fabricación del dispositivo y para permitir que el dispositivo se fabrique en cantidades comercialmente viables.

- 45 Preferiblemente, el dispositivo comprende una tira reactiva hecha de materiales polímeros o cerámicos. Preferiblemente, el dispositivo comprende dos o más electrodos planos. Preferiblemente, el dispositivo comprende un "electrodo de referencia" además del electrodo de prueba. Al menos el electrodo de prueba incorpora la As^{III} oxidasa.

- 50 El dispositivo incluye un mediador redox. El término "mediador redox" se define como cualquier resto capaz de transferir electrones desde la enzima a la superficie del electrodo. Mediadores redox artificiales como 2,6-diclorofenolindifenol (DCPIP) se usan frecuentemente en solución en mediciones espectrofotométricas basadas en el laboratorio; sin embargo, las mediciones espectrofotométricas no se usan de forma rutinaria en equipos de pruebas de campo. Es ventajosa la inclusión de un mediador redox en varias formas diferentes, en comparación con los

dispositivos existentes en los que la enzima está directamente ligada al electrodo. La presencia de un mediador redox mejora la eficacia de la transferencia de electrones y reduce los efectos de la química de superficie del electrodo en las corrientes medidas. Esto permite usar una gama mucho más amplia de materiales de electrodos. Como las corrientes de fondo debidas a los componentes de la muestra dependen del material del electrodo, esto da mayor versatilidad en la optimización de la señal de fondo.

Como se muestra en el Ejemplo 2, se puede usar una amplia gama de mediadores en el dispositivo electroquímico sensible a As^{III} de la invención. Ejemplos de mediadores redox adecuados incluyen, pero no se limitan a, complejos metálicos donde el metal existe en dos o más estados redox diferentes, por ejemplo complejos de hierro, rutenio u osmio, moléculas orgánicas que pueden existir en dos o más estados redox accesibles, por ejemplo citocromos, polímeros orgánicos conductores, sales orgánicas conductoras, 2,6-diclorofenolindofenol, ferroceno y derivados de ferroceno que incluyen ácido ferroceno carboxílico e hidroximetil ferroceno (ferroceno metanol), Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio (II), tetratíafulvaleno (TTF) y quinonas que incluyen, pero no se limitan a, benzoquinona e hidroquinona. Sin embargo, no todos los mediadores redox son eficaces con Aio (arsenito oxidasa), por ejemplo, se ha encontrado que el cloruro de tetraamina rutenio (III), el azul de metileno, el ferricianuro y el oxígeno no son eficaces.

Ventajosamente, el dispositivo de la invención es versátil y se ha demostrado que funciona con una variedad de materiales de electrodos de prueba (véase Ejemplo 2 a continuación). Preferiblemente, el electrodo de prueba está hecho de uno o más materiales conductores que incluyen, pero no se limitan a, carbono, nanotubos de carbono, grafeno, grafito, oro, platino, paladio, carbono vítreo, óxidos metálicos nanoestructurados o metal nanoestructurado.

Preferiblemente, el electrodo de referencia comprende un par redox de referencia, como $Ag/AgCl$.

Los materiales del electrodo se pueden depositar en la tira reactiva mediante una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, serigrafía o evaporación. Los electrodos pueden estar abiertos o cubiertos por una tapa para formar una celda de volumen definido. Puede o puede no haber una membrana que cubra los electrodos.

La tira reactiva es adecuada para uso de laboratorio y, preferiblemente, para uso en el campo (es decir, se puede detectar As^{III} en una muestra en la fuente usando la tira reactiva o el dispositivo). El dispositivo puede ser adecuado para múltiples usos o un solo uso y puede ser desechable.

Preferiblemente, el dispositivo comprende una superficie microestructurada con la enzima atrapada en el mismo con un mediador (véase Figura 1). Una superficie microestructurada, por ejemplo, columnas que se elevan sobre la base del electrodo, mejora el rendimiento del electrodo.

Preferiblemente la muestra en la que se detecta As^{III} usando el dispositivo de la invención es una muestra líquida. La muestra líquida puede ser cualquier tipo de líquido que sea susceptible a la contaminación por As^{III} que incluye, pero no se limita a, agua subterránea, agua potable, líquidos ambientales como efluentes y aguas residuales mineros, aguas residuales, muestras biológicas.

En uso, la muestra de prueba se pone en contacto directo con la tira reactiva. El funcionamiento del dispositivo sensor implica la aplicación de un potencial eléctrico entre los electrodos de prueba y de referencia y medir la corriente. Serán evidentes para los expertos en la técnica una serie de métodos, e incluyen, pero no se limitan a, cronoamperometría, voltametría de onda cuadrada y coulometría. Se puede medir la respuesta al As^{III} desde 5 μM a 40 μM con el mismo sensor mostrando resultados comparables al día siguiente (véase Figura 2).

Las ventajas de usar el dispositivo de la invención como se describe anteriormente para probar la presencia de As^{III} en una muestra son que la sensibilidad por el analito es alta y la prueba es específica para As^{III} (es decir, la forma soluble más tóxica de arsénico) debido a la presencia de la enzima; la prueba es rápida y los resultados se obtienen casi instantáneamente; el dispositivo es simple de usar; los resultados son reproducibles y el dispositivo se puede producir y comprar a bajo coste (particularmente importante para su uso en países en desarrollo).

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Procedimientos experimentales

Cepas bacterianas, plásmido y condiciones de crecimiento

Se usaron cepas DH5 α , JM109 λ pir, RK4353, C43, BL21 y Origami de *Escherichia coli* para probar la expresión de la arsenito oxidasa NT-26. Se usó el vector de expresión pPROEX-HTb (Invitrogen) con fines de expresión. Todas las condiciones de expresión implicaron el crecimiento de *E. coli* en LB que contenía 100 $\mu g/ml$ de ampicilina, ya sea aeróbicamente (con aireación a 170 rpm (relación líquido a espacio a la cabeza de 1:5) o anaeróbicamente con nitrato (14 mM) o DMSO (14 mM) como aceptores de electrones y lactato sódico (20 mM) como el donante de electrones.

Clonación y expresión

Los genes *aioB* y *aioA* (*aioBA*) NT-26 se amplificaron sin la secuencia líder nativa Tat usando los siguientes cebadores:

Directo:

PROEXAroBFHis 5'-GCGAATTCAAGCTACCGCGCGGCAGGGGTC-3' (SEQ ID N°. 9)

5 Inverso:

PROEXAroAR 5'-GCCTGCAGTCAAGCCGACTGGTATTCTTTCTGA-3' (SEQ ID N°. 10)

Se usaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* (subrayadas anteriormente) para facilitar la clonación en el vector de expresión, pPROEX-HTb. El pPROEX-HTb que lleva los genes *aioBA* se transformó en una variedad de cepas de *E. coli* para determinar cual daba una expresión óptima. Se probaron una variedad de concentraciones de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) y de molibdato sódico (Mo) así como tiempos de inducción. Las condiciones de expresión óptimas finales usadas para la purificación de la Aio implicaron crecer DH5α aeróbicamente a 21°C durante 24 horas en LB que contenía IPTG 40 μM y Mo 1 mM.

Purificación de arsenito oxidasa recombinante

Se purificó Aio recombinante a partir de DH5α usando una combinación de cromatografía de afinidad y de exclusión por tamaño. Las células se recogieron por centrifugación a 9.700 x g durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se juntaron y se lavaron suspendiendo en tampón de unión (10 ml/g de peso húmedo de células) (fosfato potásico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, imidazol 20 mM, pH 7,2) y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos. El sedimento celular se resuspendió entonces en tampón de unión (10 ml/g de peso húmedo de células). Las células de *E. coli* se rompieron mediante un único paso a través de una célula de presión francesa (12.000 psi) y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 30.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se cargó en una columna de cromatografía de afinidad cargada pre-empaquetada con Ni GraviTrap (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante, excepto con una modificación menor; el volumen de lavado usado fue de 120 ml. Se desaló el eluyente en tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 50 mM (pH 5,5) lo que dio como resultado la precipitación de proteína(s) que co-eluyen no diana que se eliminaron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 μm (Millipore), se concentró usando un concentrador de centrifuga Vivaspin 20 (100.000 de MWCO) (GE Healthcare) y se cargó en una columna de filtración en gel Superdex 200 (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón MES 50 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5. La cromatografía se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se juntaron las fracciones de 0,25 ml que contenían actividad Aio y se concentraron usando un concentrador de centrifuga Vivaspin 20 (100.000 de MWCO).

La confirmación de la masa molecular nativa de la Aio recombinante se hizo usando una columna de cromatografía de filtración en gel Superdex 200 (GE Healthcare). Se creó una curva de calibración usando un kit de calibración de filtración en gel (GE Healthcare) de proteínas de masa molecular conocidas (Tiroglobulina 669 kDa, Ferritina 440 kDa, Aldolasa 158 kDa, Conalbúmina 75 kDa, Ovoalbúmina 43 kDa) y se determinó el volumen de exclusión de la columna usando Azul de dextrano 2000 (2.000 kDa). Las condiciones de cromatografía usadas fueron según las instrucciones del fabricante con una velocidad de flujo de 0,3 ml/min.

Resultados y discusión

Expresión heteróloga y purificación de la arsenito oxidasa recombinante

En este estudio, los genes *aioB* y *aioA* (designados *aioBA*) se clonaron sin la secuencia líder Tat de *aioB* permitiendo la expresión en el citoplasma de *E. coli*. Se probaron una combinación de diferentes cepas y condiciones de crecimiento para optimizar la expresión de Aio. Sorprendentemente, la mayor actividad específica de Aio se obtuvo con las cepas DH5α y JM109λ_{pir} K12 de *E. coli*.

De manera interesante, también hubo una variación de la actividad de Aio cuando se usaron diferentes aceptores de electrones (Figura 3), con nitrato el aceptor de electrones óptimo. Dado el mayor rendimiento celular obtenido con crecimiento aeróbico, se eligieron DH5α y condiciones óxicas para estudios adicionales. La As^{III} oxidasa recombinante se purificó a partir de *E. coli* usando una combinación de cromatografía de Ni-NTA y de exclusión por tamaño. Basándose en la electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, la enzima recombinante tenía una pureza de >99% y contenía las dos subunidades de Aio conocidas, AioA (93 kDa) y AioB (21 kDa) (véase Figura 4). En base a la cromatografía de exclusión por tamaño la masa molecular nativa de la enzima fue de 219 kDa que es consistente con el estado oligomérico α₂β₂ de la enzima nativa purificada a partir de NT-26 (Santini & vanden Hoven, 2004, J. Bacteriology 186(6): 1614-1619).

Ejemplo 2

Se realizaron varios experimentos para demostrar que la enzima descrita dentro de la solicitud de patente se puede usar en un dispositivo electroquímico mediado por enzima para detectar arsenito en agua. Los resultados demuestran

que en el dispositivo se puede usar una gama de moléculas mediadoras redox y que también se puede variar el material del electrodo.

Materiales y métodos

Los electrodos serigrafiados se compraron en Dropsens (Oviedo, España). Los electrodos serigrafiados con carbono tienen un electrodo de trabajo de carbono (4 mm de diámetro) y un contra electrodo y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (referencia del producto DRP-C110). Los electrodos serigrafiados con nanotubos de carbono tienen un electrodo trabajo de nanotubos de carbono de paredes múltiples (4 mm de diámetro), un contra electrodo y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (referencia del producto DRP-110CNT). El electrodo serigrafiado con oro tiene un electrodo de trabajo de oro (4 mm de diámetro) y un contra electrodo y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (referencia del producto DRP-220AT). Las mediciones electroquímicas (voltametría cíclica y crono amperometría) se registraron usando un instrumento potencioestático CompactStat.e (Ivium Technologies) y el software IviumSoft (Ivium Technologies). Los mediadores 2,6-diclorofenolindofenol, ácido ferroceno carboxílico, hidroximetil ferroceno (ferroceno metanol), tetratíafulvaleno (TTF) y Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio (II) se compraron todos en Sigma Aldrich. La solución de arsenito sódico (Fluka) 50 mM también se compró en Sigma Aldrich.

En todos los experimentos los electrodos de trabajo, contra- y de referencia se recubrieron completamente con 200 μ l de una solución tamponada que contenía la cantidad requerida de mediador, de enzima arsenito oxidasa y de arsenito para cada experimento. Se registraron los voltagramas cíclicos usando electrodos de carbono, de nanotubos de carbono y de oro con una solución de hidroximetil ferroceno 0,5 mM (PBS 10 mM, pH 7,1, KCl 100 mM) que contenía 0,05 U de arsenito oxidasa (0,17 nanomoles) con y sin arsenito sódico 500 micromolar. Se usó una velocidad de escaneo de 5 mV/s. La crono amperometría se realizó usando una solución de hidroximetil ferroceno 0,25 mM (PBS 10 mM, pH 7,1, KCl 100 mM) que contenía 0,05 U de arsenito oxidasa (0,17 nanomoles) con arsenito sódico 0 y 50 micromolar cuando se usa un electrodo de carbono y con arsenito sódico 0, 12,5, 25, 50 y 100 micromolar cuando se usa un electrodo de oro. La solución se mezcló entre cada ejecución de crono amperometría. Se registraron ejecuciones por triplicado para cada concentración de arsenito y se representaron los valores promedio. Se aplicó un potencial de un paso de 0,35 V (frente a Ag/AgCl) para cada ejecución.

Se registraron los voltamogramas cíclicos usando electrodos de carbono y de nanotubos de carbono con una solución de Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio (II) 1 mM (PBS 10 mM, pH 7,1, KCl 100 mM) que contenía 0,05 U de arsenito oxidasa (0,17 nanomoles) con y sin arsenito sódico 500 micromolar. Se usó una velocidad de escaneo de 5 mV/s.

Se registraron los voltamogramas cíclicos usando electrodos de carbono y oro con una solución de ácido ferroceno carboxílico 1 mM (PBS 10 mM, pH 7,1, KCl 100 mM) que contenía 0,1 U de arsenito oxidasa (0,34 nanomoles) con y sin arsenito sódico 1 mM. Se usó una velocidad de escaneo de 5 mV/s. La crono amperometría se realizó usando una solución de ácido ferroceno carboxílico 1 mM (PBS 10 mM, pH 7,1, KCl 100 mM) que contenía 0,1 U de arsenito oxidasa (0,34 nanomoles) con arsenito sódico 0, 50 y 100 micromolar con un electrodo de carbono. Se realizó una única etapa de ejecución aplicando un potencial de 0,38 V (frente al electrodo de referencia de Ag/AgCl). La solución se mezcló entre cada ejecución de crono amperometría. Se registraron ejecuciones por duplicado para cada concentración de arsenito.

Se registraron los voltamogramas cíclicos usando electrodos de carbono, de nanotubos de carbono y de oro con una solución de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) 1 mM (MES 50 mM, pH 5,5, KCl 100 mM) que contenía 0,05 U de arsenito oxidasa (0,17 nanomoles) con y sin arsenito sódico 500 micromolar. Se usó una velocidad de escaneo de 5 mV/s.

Se registraron los voltamogramas cíclicos usando un electrodo de nanotubos de carbono depositando primero 6 μ l de tetratíafulvaleno (TTF) 2 mM en acetona sobre el electrodo de trabajo y dejándolo secar durante 10 minutos. El electrodo serigrafiado de electrodo se sumergió luego en 200 μ l de una solución (PBS 10 mM, pH 7,1, KCl 100 mM) que contenía 0,05 U de arsenito oxidasa (0,17 nanomoles) con y sin arsenito sódico 500 micromolar. Se usó una velocidad de escaneo de 50 mV/s.

Resultados

Los mediadores 2,6-diclorofenolindofenol, ácido ferroceno carboxílico, ferroceno metanol y Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio (II) mostraron todos comportamiento redox reversible en presencia de la enzima (picos de corrientes catódica y anódica muy similares) y un pico de corriente catódica aumentado en relación con el pico de corriente anódica en presencia de la enzima y arsenito. Esta es una respuesta típica de un dispositivo electroquímico mediado por enzima.

Las Figuras 5 (a-f) muestran voltagramas cíclicos de ferroceno metanol como mediador con electrodos serigrafiados de carbono (a y b), de nanotubos de carbono (c y d) y de oro (e y f) sin (a, c, e) y con (b, d, f) arsenito sódico 500 micromolar. La Figura 5g muestra gráficos de crono amperometría de ferroceno metanol más enzima, y ferroceno metanol más enzima más arsenito 50 μ M registrados usando un electrodo de carbono. Las Figuras 5h y 5i muestran gráficos de crono amperometría de ferroceno metanol más enzima y ferroceno metanol más enzima más arsenito 0, 12,5, 25, 50 y 100 micromolar registrados usando un electrodo de oro. La Figura 5i es una parte ampliada de la Figura

5h. La Figura 5j es un gráfico que muestra una respuesta lineal a la dosis de la corriente frente a la concentración de arsenito y se refiere a los gráficos de crono amperometría en las Figuras 5h y 5i, que representan los valores de corriente tomados a 4 segundos a partir de los gráficos de crono amperometría.

5 La Figuras 6 (a-d) muestran voltamogramas cíclicos de Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio (II) como mediador con electrodos serigrafiados de carbono (a y b) y de nanotubos de carbono (c y d), sin (a y c) y con (b y d) arsenito 500 micromolar.

Las Figuras 7a y 7b muestran voltamogramas cíclicos de ácido ferroceno carboxílico como mediador con electrodos serigrafiados de carbono (2a) y de oro (2b). La Figura 2c muestra unos gráficos de crono amperometría de ácido ferroceno carboxílico más enzima con arsenito 0, 50 y 100 micromolar.

10 Las Figuras 8 (a-f) muestran voltamogramas cíclicos de 2,6-diclorofenolindofenol como mediador con electrodos serigrafiados de carbono (a y b), de oro (c y d) y de nanotubos de carbono (e y f), sin (a, c, e) y con (b, d, f) arsenito 500 micromolar.

La Figura 9 muestra voltamogramas cíclicos de TTF como mediador con electrodos serigrafiados de nanotubos de carbono sin y con arsenito 500 micromolar.

15 Los gráficos de crono amperometría muestran un cambio a valores de corriente altos en presencia de arsenito y hubo una respuesta lineal a la dosis en el cambio de corriente frente a la concentración de arsenito.

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo modificado para expresar una enzima arsenito oxidasa heteróloga modificada para prevenir la translocación al periplasma en donde la enzima comprende la subunidad AioA nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, y la subunidad AioB nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, en donde se modifica una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la secuencia de translocación, preferiblemente en donde el microorganismo es *E. coli.*, preferiblemente en donde el microorganismo es la cepa DH5 α o JM109 λ .pir de *E. coli.*
2. Un método para producir arsenito oxidasa recombinante que comprende expresar una arsenito oxidasa modificada en un microorganismo heterólogo, en donde la enzima arsenito oxidasa se modifica para prevenir la translocación al periplasma, en donde la enzima comprende la subunidad AioA nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, y la subunidad AioB nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, en donde se modifica una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la secuencia de translocación.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el microorganismo heterólogo es *E. coli.*, preferiblemente en donde la cepa de *E. coli.* es DH5 α o JM109 λ .pir.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, que comprende clonar *aioBA* modificado en un vector, en donde se modifica la parte del gen *aioB* nativo que codifica la secuencia señal de translocación, o un fragmento de esta que codifica un fragmento funcional de la secuencia señal de translocación, preferiblemente en donde el vector es el vector pPROEX HTb, preferiblemente en donde se usan las secuencias cebadoras identificadas en esta memoria como SEQ ID N°. 9 y/o SEQ ID N°. 10 para clonar los genes modificados dentro del vector.
5. Un dispositivo para detectar la presencia de arsenito en una muestra, que comprende al menos un electrodo, una enzima arsenito oxidasa y un mediador redox, en donde la enzima comprende la subunidad AioA nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, y la subunidad AioB nativa de *Rhizobium sp.* NT-26 o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, en donde se modifica una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad AioB nativa que corresponde a la secuencia señal de translocación o un fragmento funcional de la secuencia de translocación para prevenir la translocación al periplasma.
6. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el electrodo está hecho de uno o más materiales conductores, preferiblemente seleccionados de carbono, nanotubos de carbono, grafeno, grafito, oro, paladio, carbono vítreo, óxidos metálicos nanoestructurados o metal nanoestructurado.
7. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o reivindicación 6, en donde el mediador redox se selecciona de complejos metálicos en donde el metal existe en dos o más estados redox diferentes, por ejemplo complejos de hierro, rutenio u osmio, y moléculas orgánicas que pueden existir en dos o más estados redox diferentes, por ejemplo citocromos, polímeros orgánicos conductores, sales orgánicas conductoras, 2,6-diclorofenolindofenol, ferroceno o derivados de ferroceno que incluyen ácido ferroceno carboxílico e hidroximetil ferroceno (ferroceno metanol), Tris(2,2'-bipiridin)diclororutenio (II), tetratíafulvaleno (TTF) y quinonas.
8. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además un electrodo de referencia, preferiblemente en donde el electrodo de referencia comprende un par redox Ag/AgCl de referencia.
9. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el dispositivo es una tira reactiva con una superficie micro-estructurada.
10. El microorganismo, método o dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde se modifica una parte del gen *aioB* nativo que codifica la secuencia señal de translocación, o una porción de esta que codifica un fragmento funcional de la secuencia señal de translocación, preferiblemente en donde se identifica la parte del gen *aioB* nativo como SEQ ID N°. 6, o un homólogo de SEQ ID N°. 6 que codifica un fragmento funcional de la secuencia señal de translocación identificada como SEQ ID N°. 2.
11. El microorganismo, método o dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la modificación es una eliminación.
12. El microorganismo, método o dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la subunidad AioB comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID N°. 3, o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 3, o está codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID N°. 7, o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 7.

13. El microorganismo, método o dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la subunidad AioA comprende la secuencia peptídica identificada como SEQ ID N°. 4, o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 4, o está codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID N°. 8, o un homólogo que retiene al menos la funcionalidad de SEQ ID N°. 8.

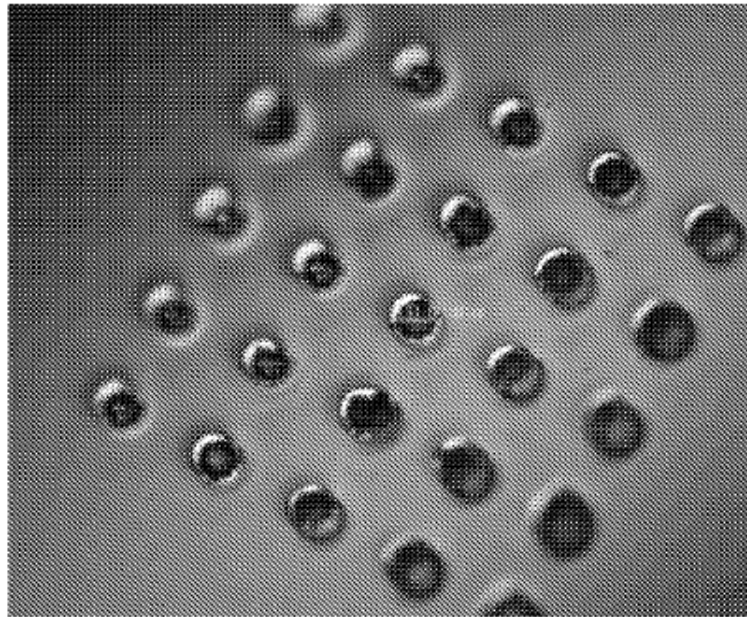


Figura 1

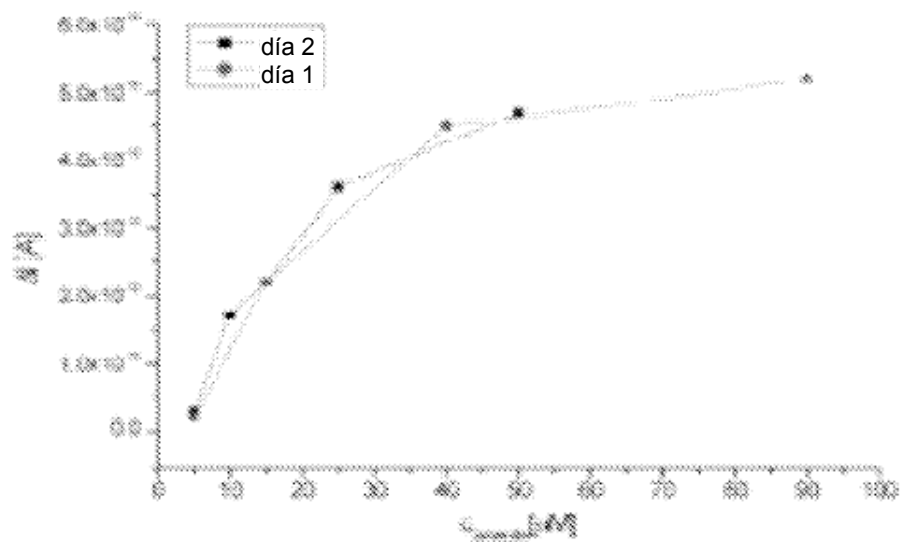


Figura 2

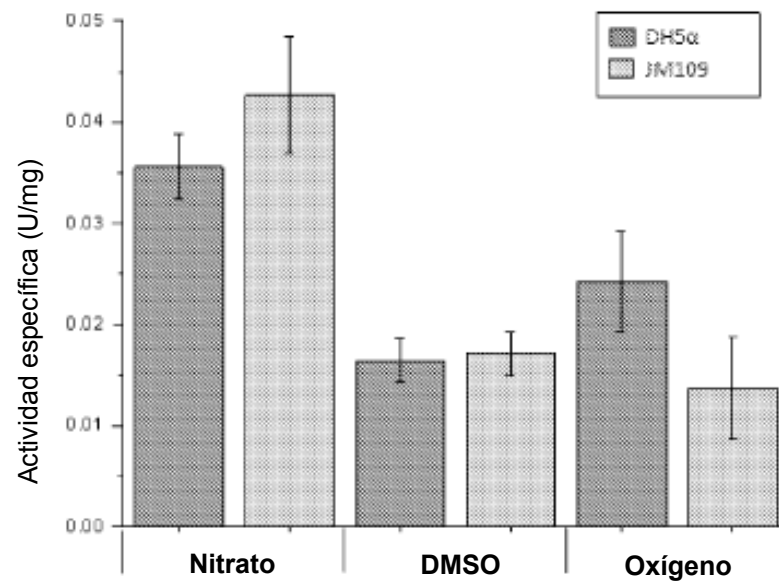


Figura 3

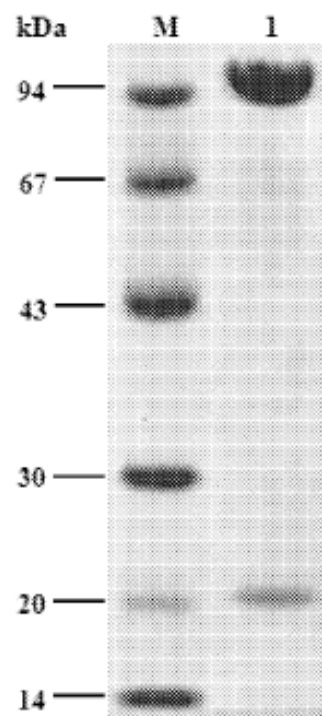


Figura 4

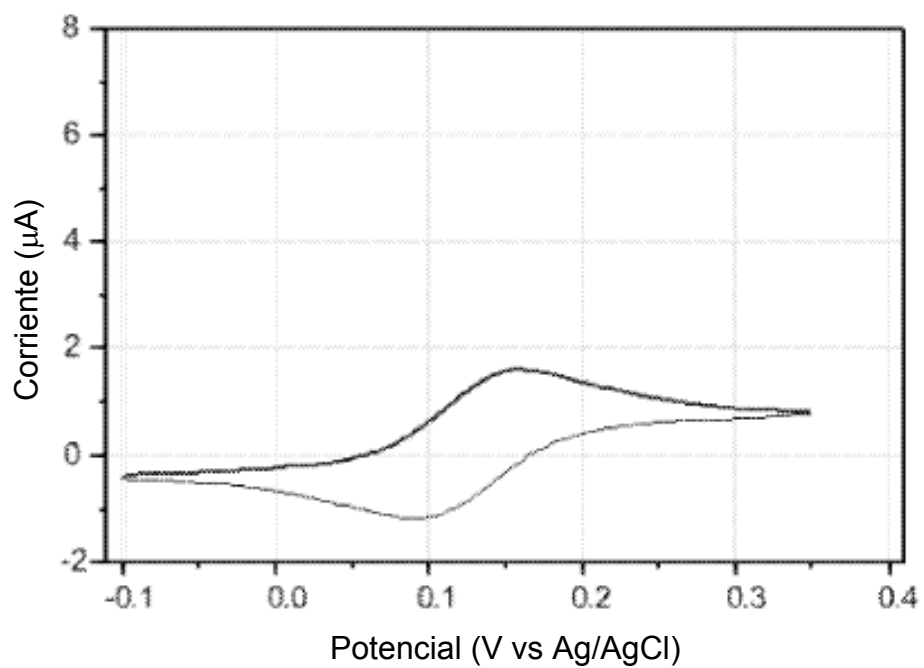


Figura 5a

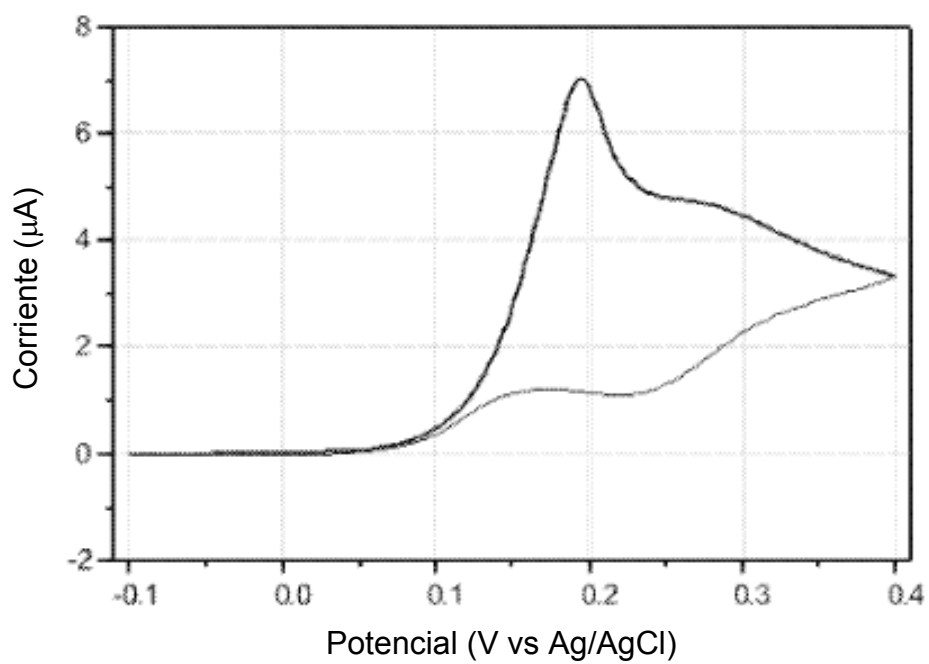


Figura 5b

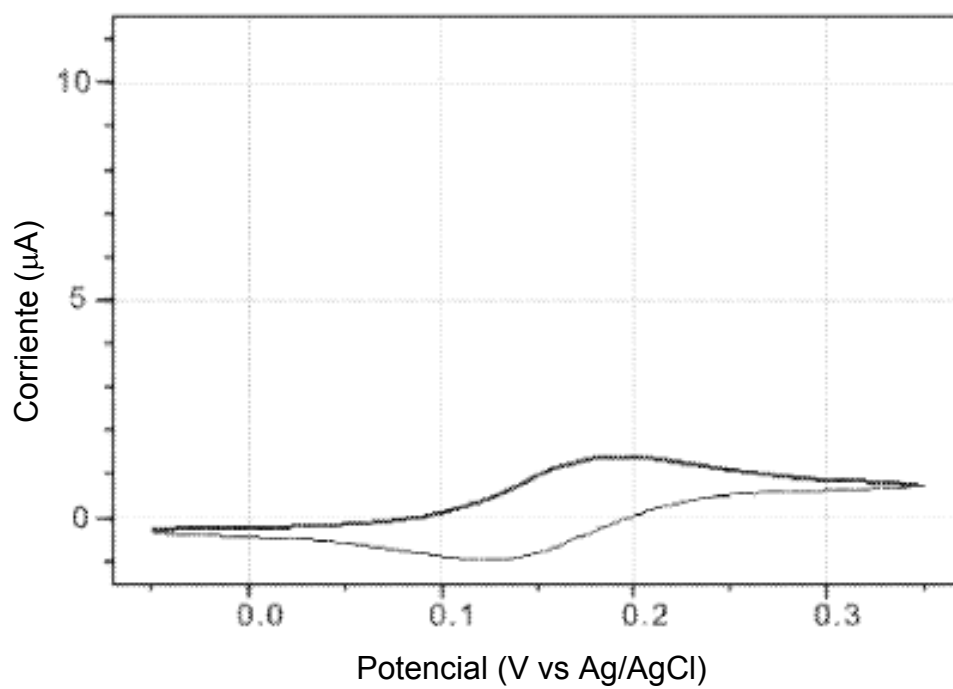


Figura 5c

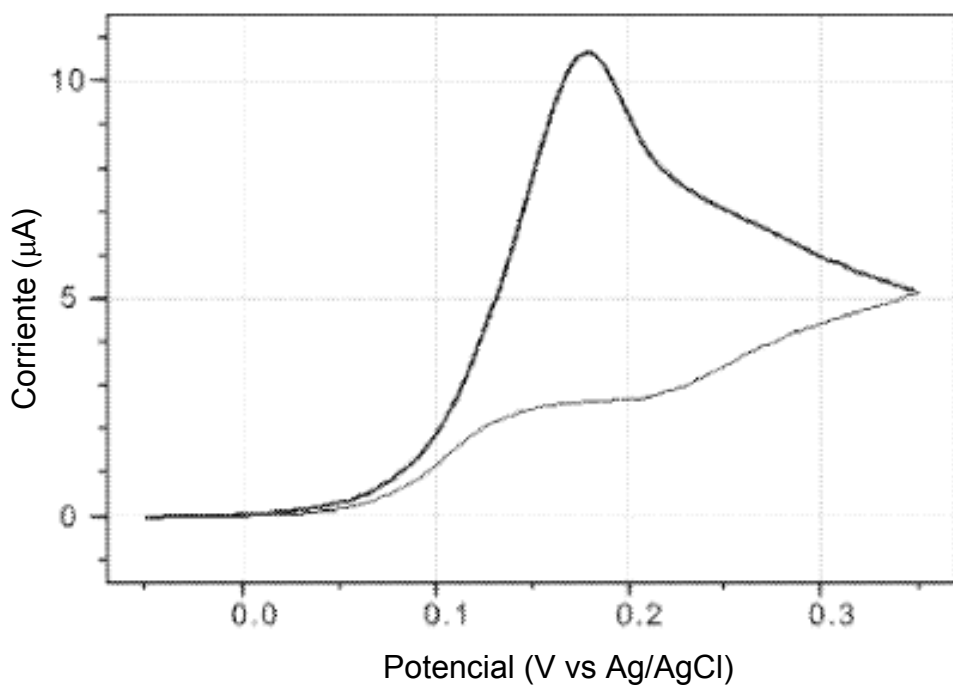


Figura 5d

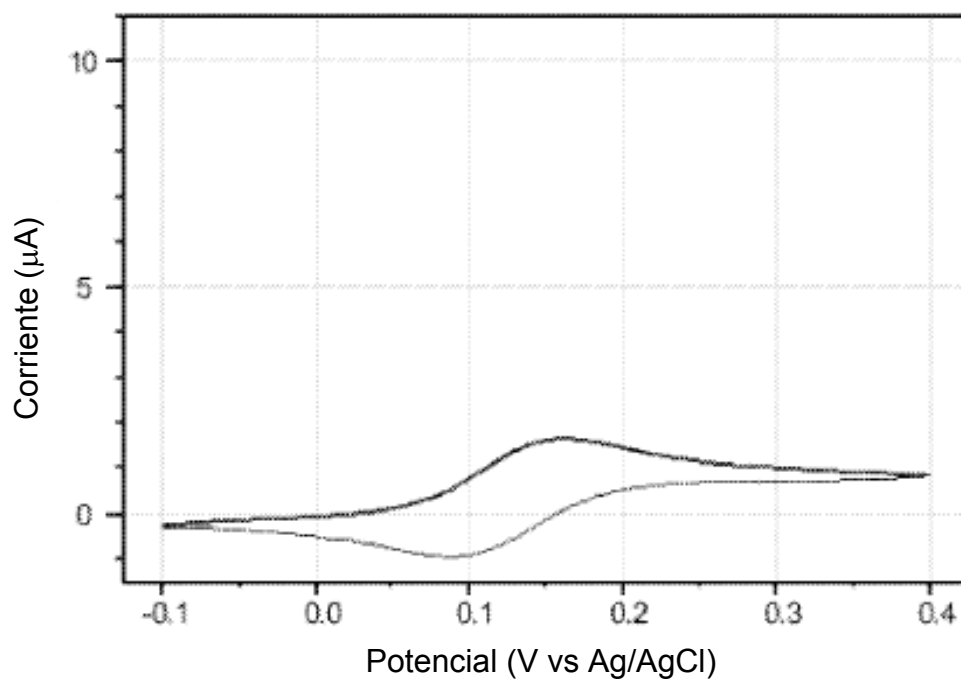


Figura 5e

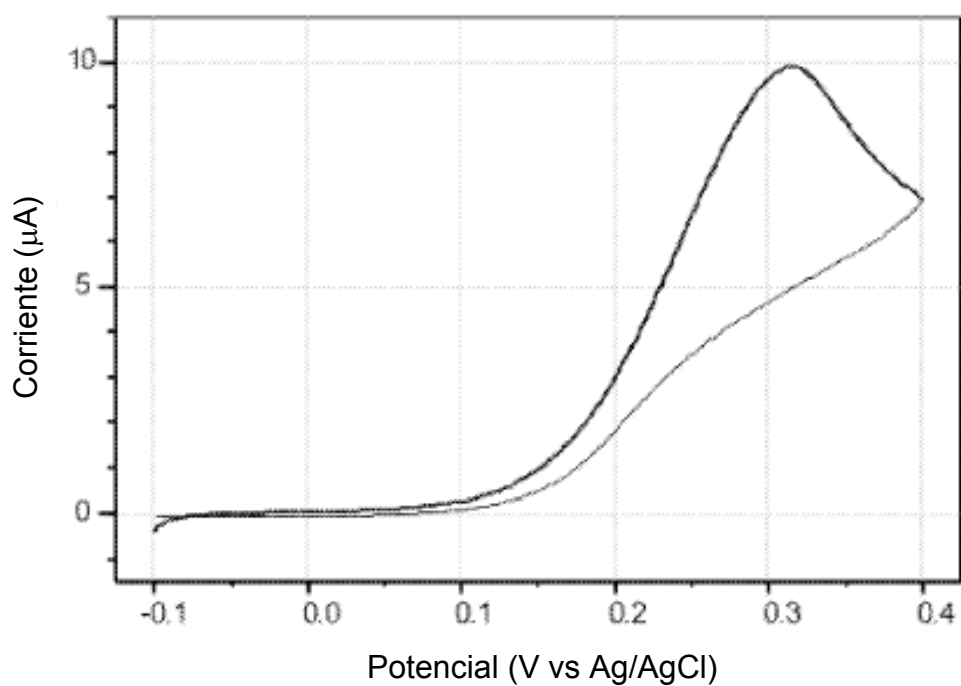


Figura 5f

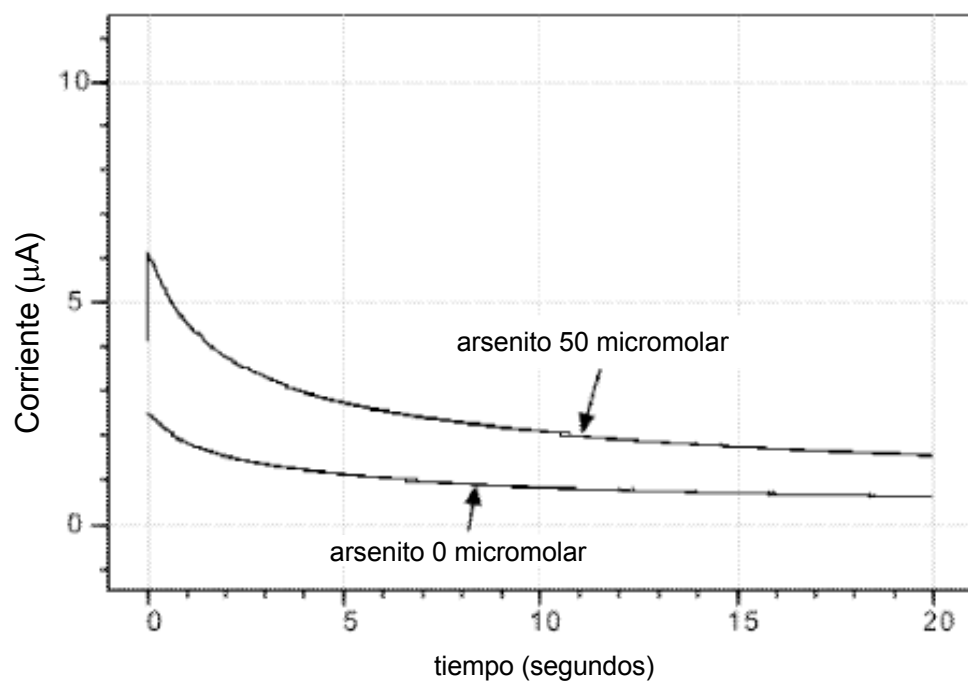


Figura 5g

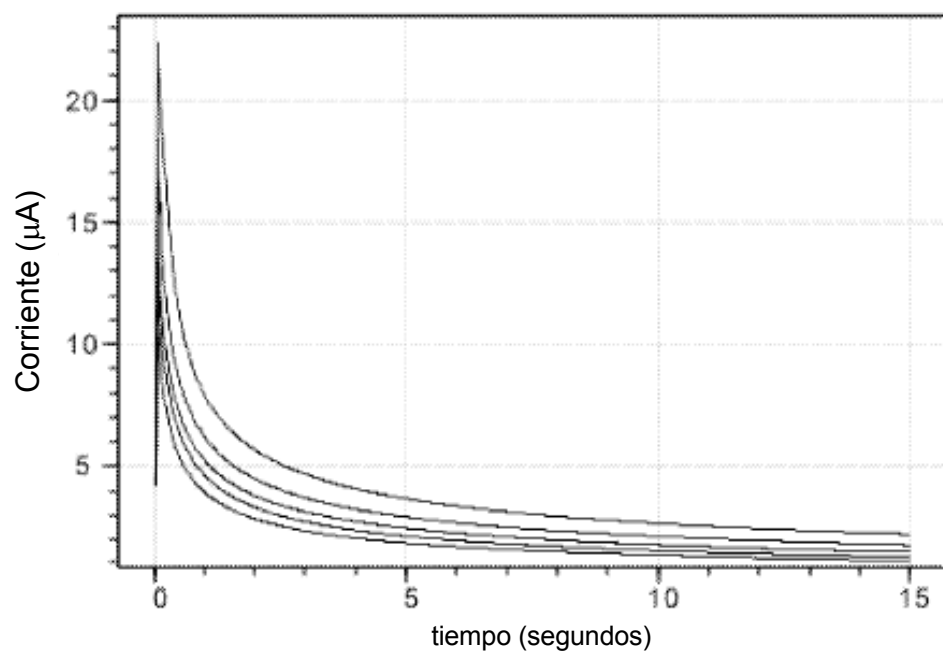


Figura 5h

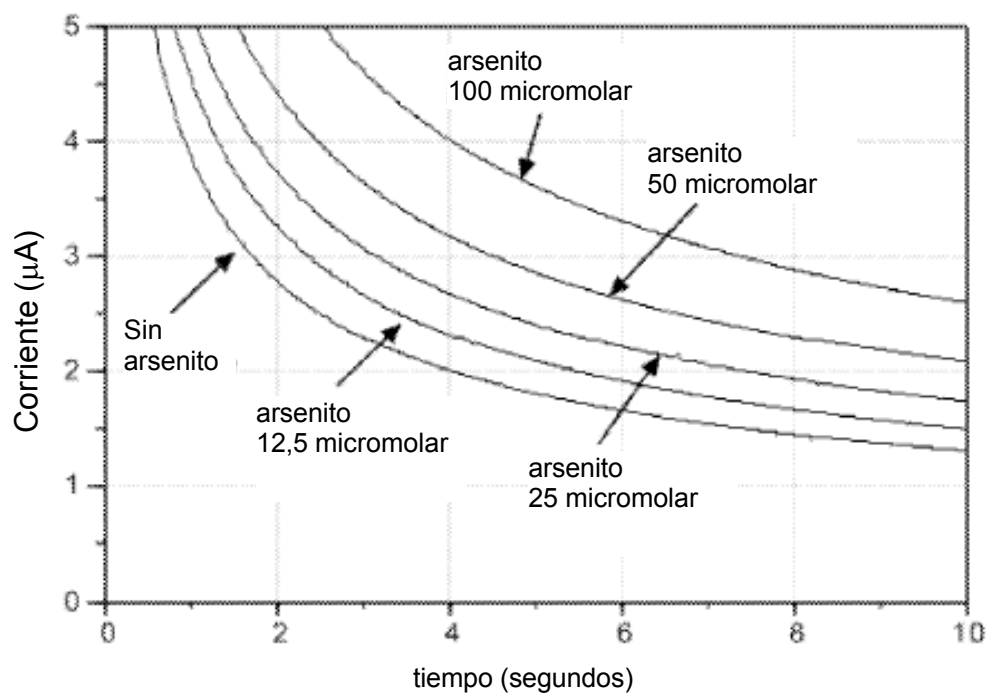


Figura 5i

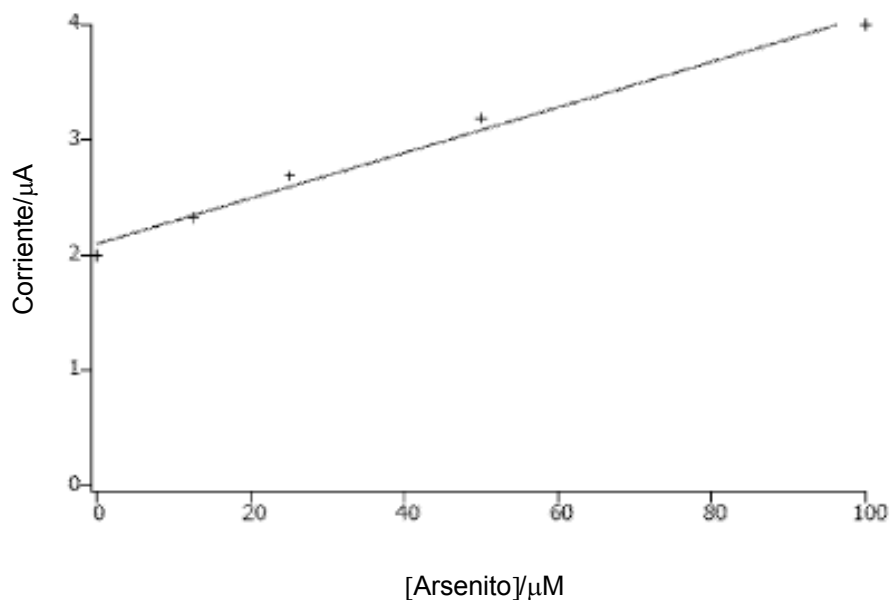


Figura 5j

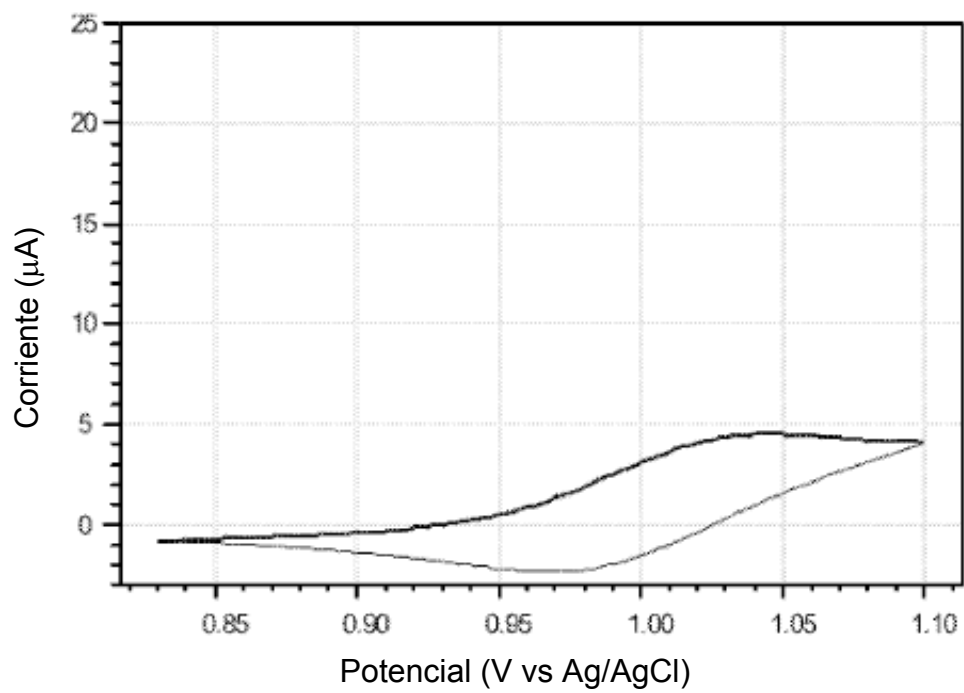


Figura 6a

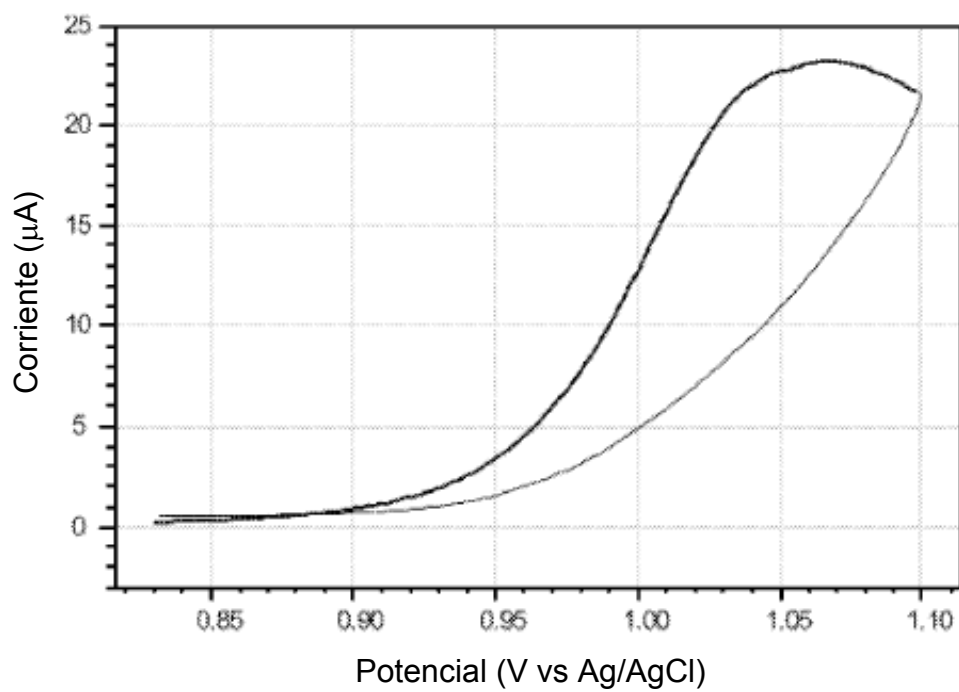


Figura 6b

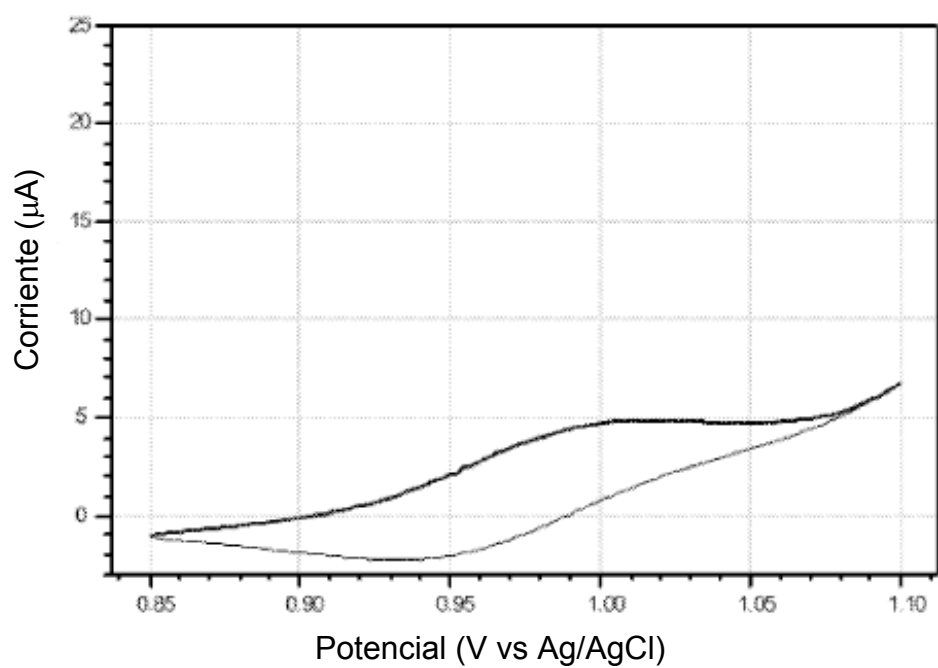


Figura 6c

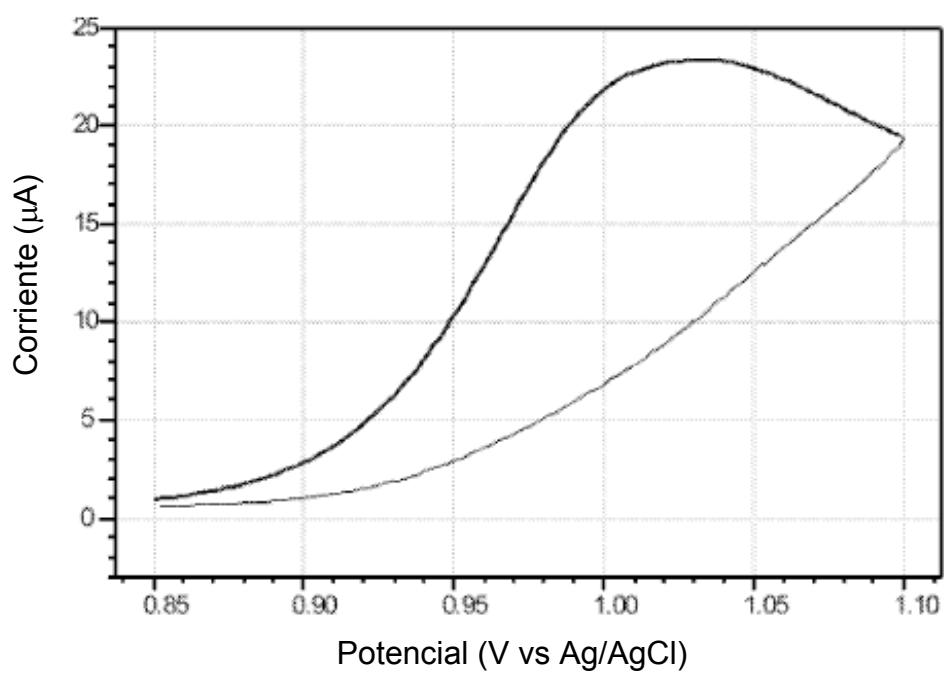


Figura 6d

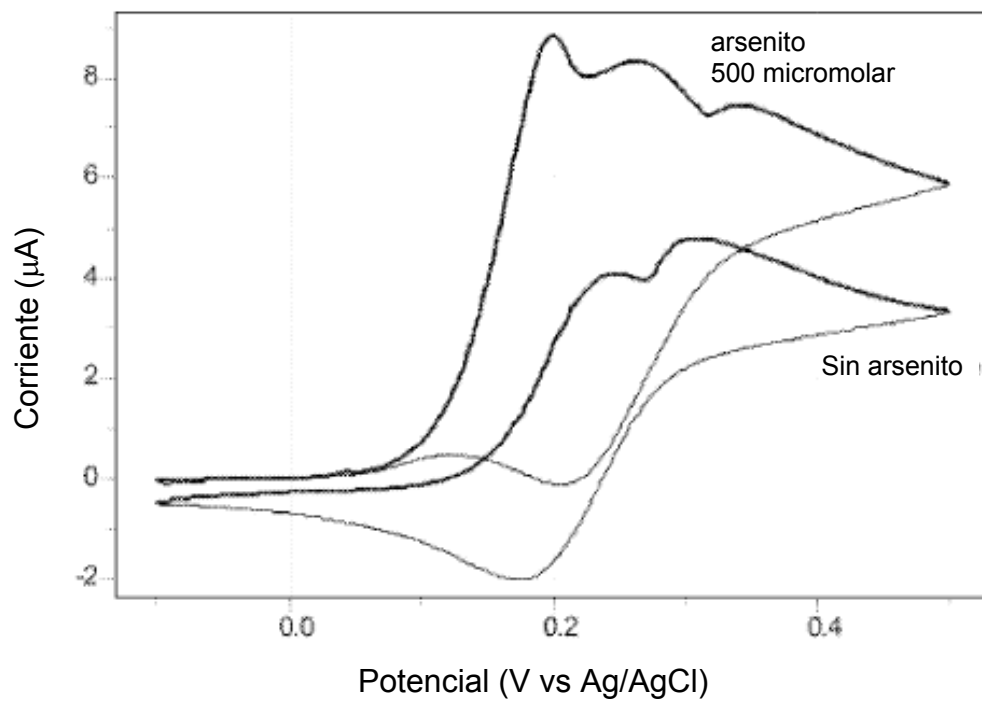


Figura 7a

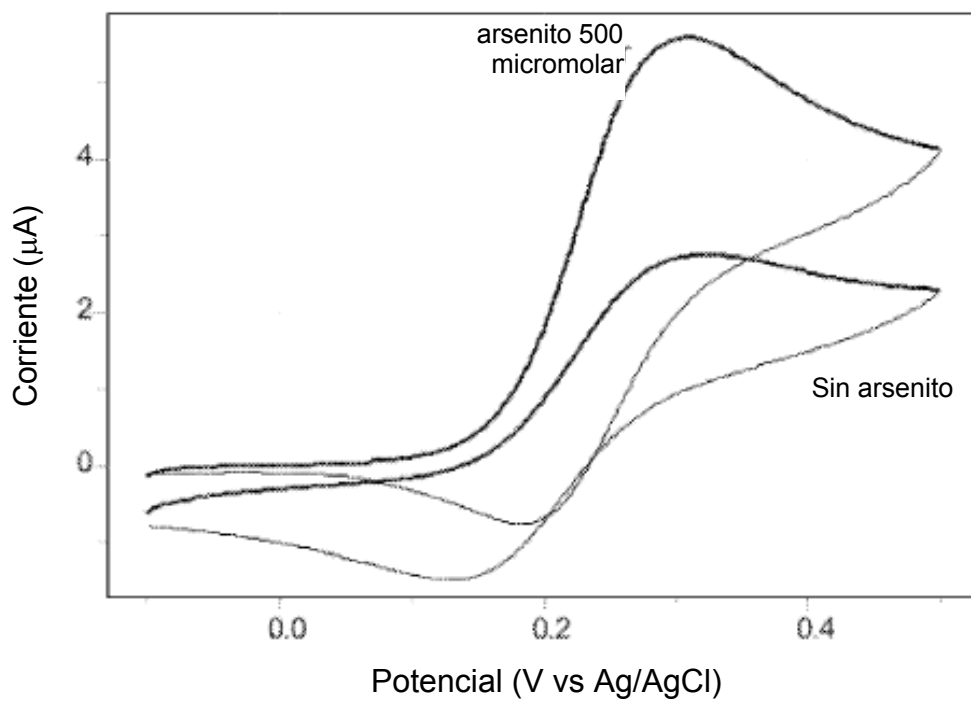


Figura 7b

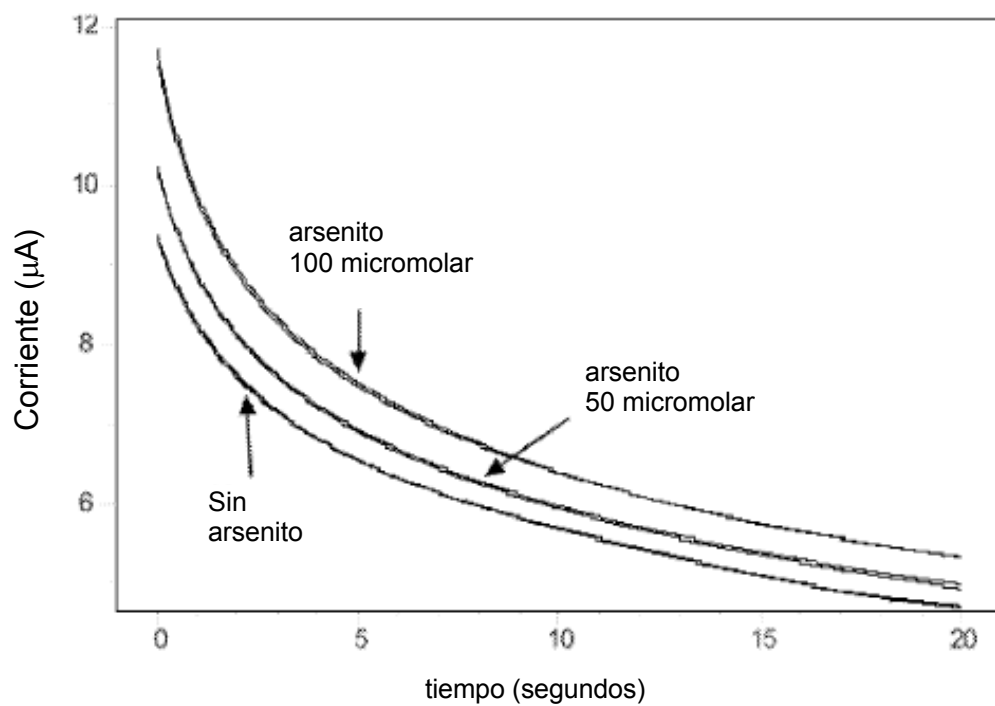


Figura 7c

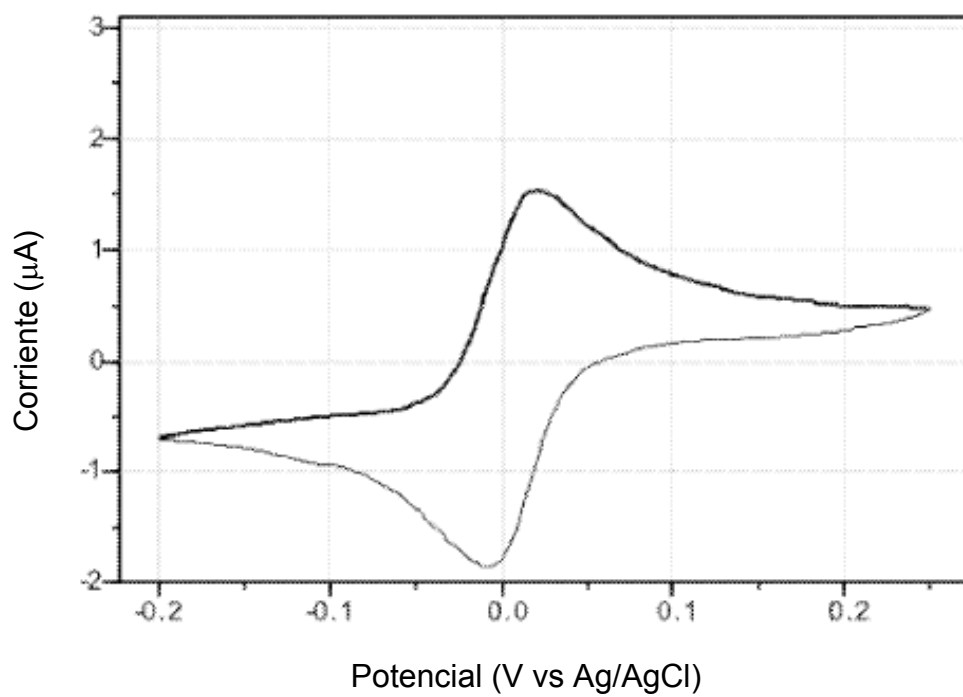


Figura 8a

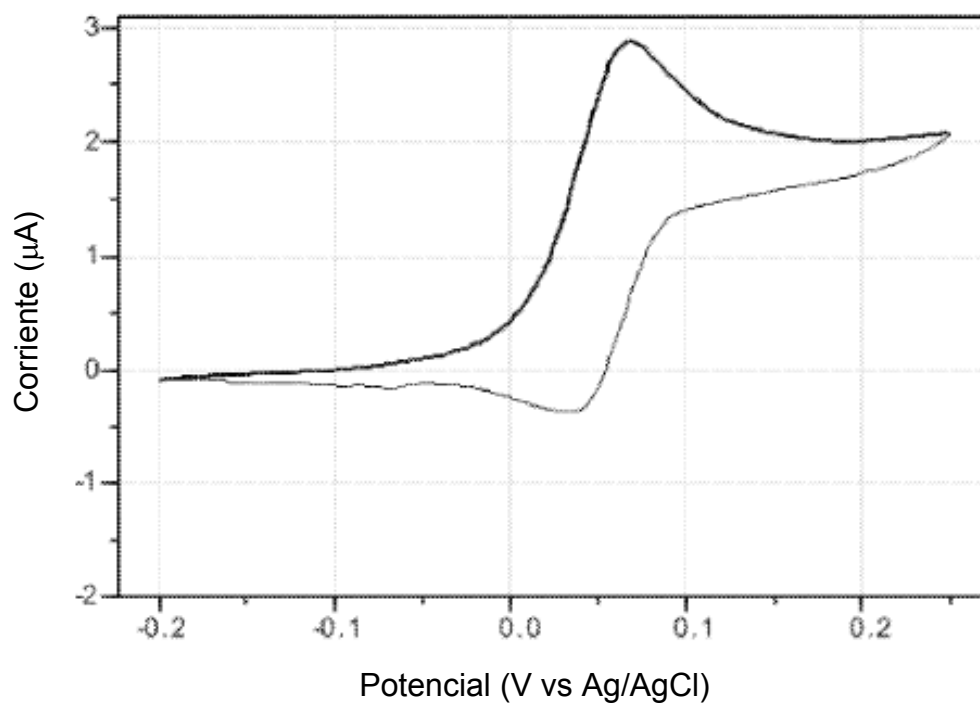


Figura 8b

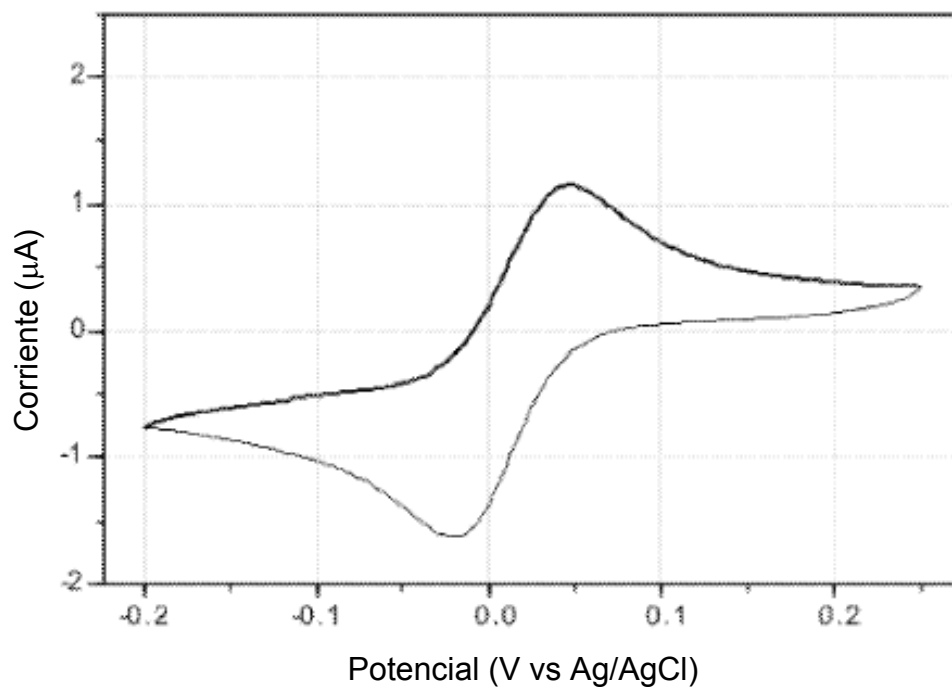


Figura 8c

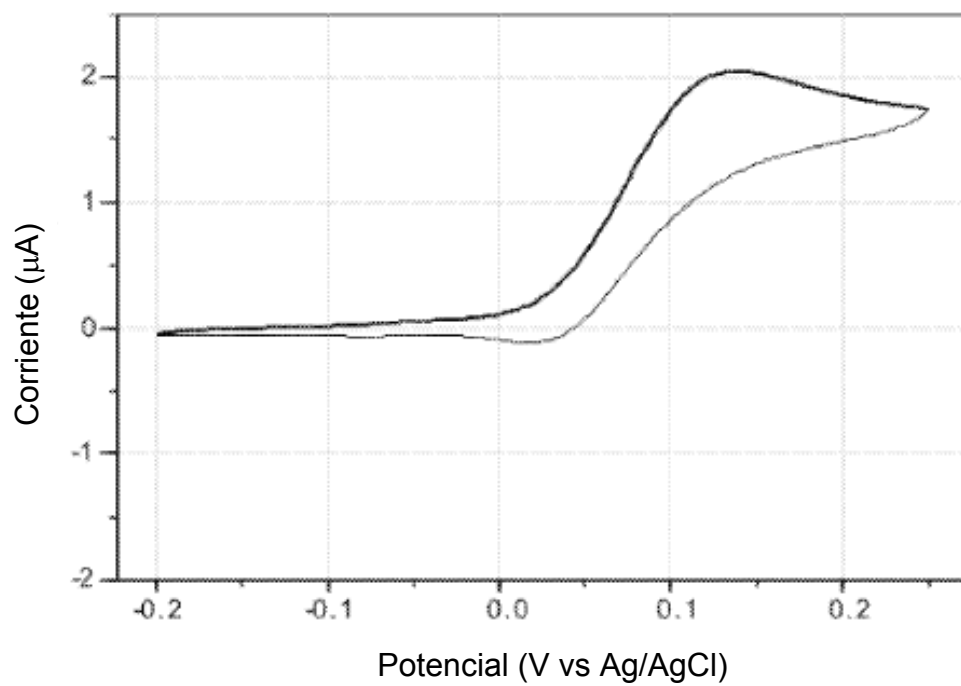


Figura 8d

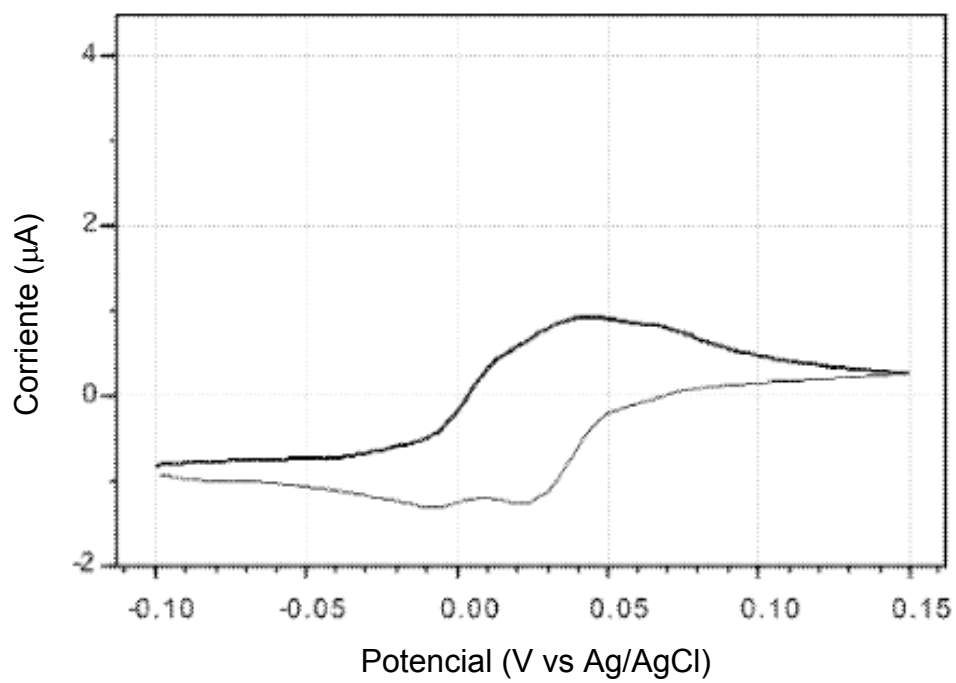


Figura 8e

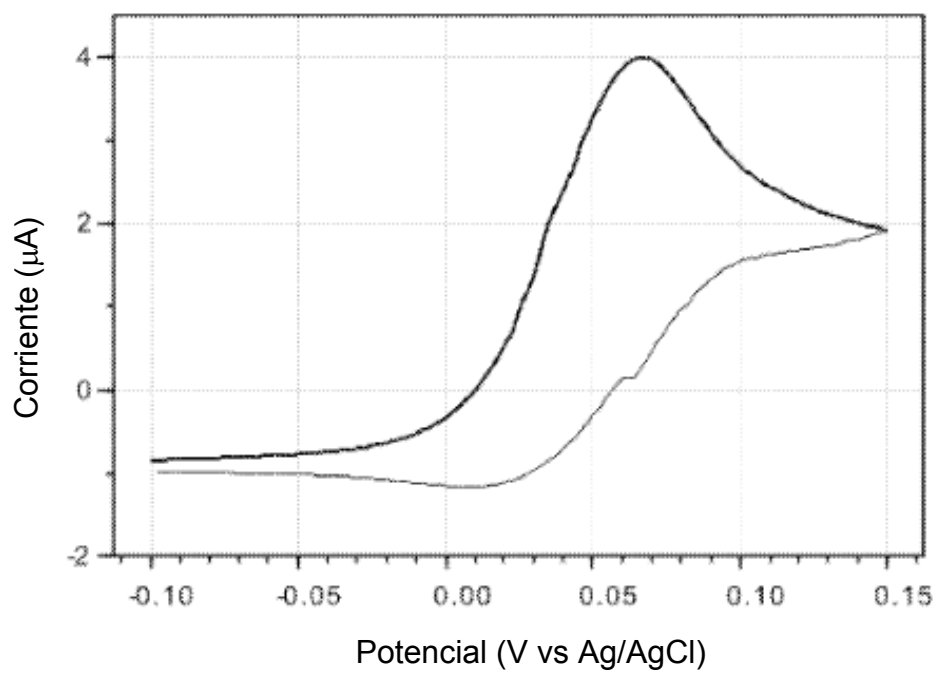


Figura 8f

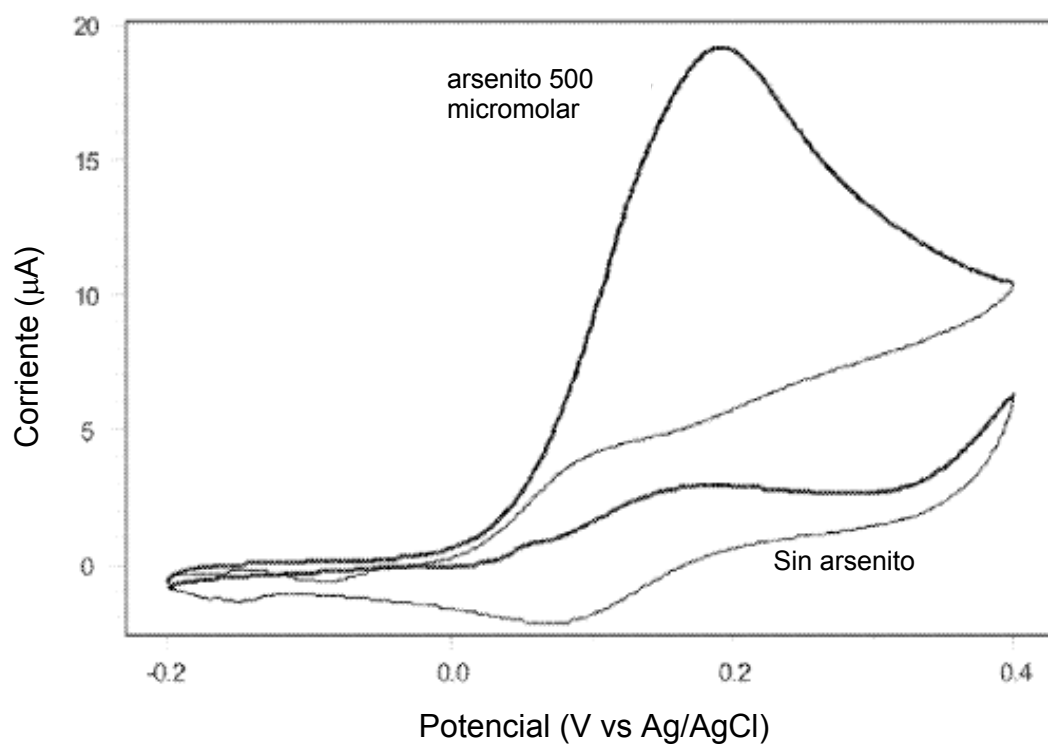


Figura 9