

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 076 872**

21 Número de solicitud: 9302297

51 Int. Cl.⁶: C12N 9/22

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **04.11.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.95**

Fecha de concesión: **23.07.96**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.96**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.96

73 Titular/es: **Universidad de Oviedo, y en su
representación D. Lorenzo Pueyo Casaus,
Vicerrector de Investigación
San Francisco, 3
33003 Oviedo, ES**

72 Inventor/es: **Sanchez Martín, Jesús**

74 Agente: **No consta**

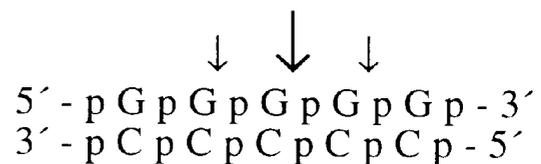
54 Título: **Desoxirriboendonucleasa de Streptomyces antibioticus CECT 3213.**

57 Resumen:
Desoxirriboendonucleasa de Streptomyces antibioticus CECT 3213.

Se describe una nueva nucleasa que hidroliza preferentemente el ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena doble por regiones de tres o más guaninas, cortando mayoritariamente ente la tercera y la cuarta y minoritariamente entre la segunda y la tercera y entre la cuarta y la quinta, como se muestra en el esquema adjunto:

Otras secuencias del tipo d(GGG↓GA), d(GGG↓GC), d(GGG↓GT), d(GCG↓GN), d(GGG↓A), d(GTG↓G), d(GAG↓G), d(GGG↓T), d(GCG↓A), d(GC↓G), d(GC↓A), d(GG↓G), d(GC↓T), d(GG↓T), donde p es un residuo de fosfato, G es guanina, C es citosina, A es adenina, T es timina y N es cualquier base, son cortadas en la posición indicada por la flecha, con menor preferencia.

El enzima se obtiene mediante un proceso de purificación específico a partir de cultivos de la cepa Streptomyces antibioticus CECT 3213.



ES 2 076 872 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Desoxirriboendonucleasa de *Streptomyces antibioticus* CECT 3213.

Estado de la técnica

Hemos purificado y caracterizado una nucleasa, no descrita previamente, a partir de la cepa bacteriana *Streptomyces antibioticus* CECT 3213. En la última edición de Nomenclatura Enzimática, del Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Enzyme Nomenclature IUBMB, Academic Press, 1992) se describen todas las nucleasas de las que se posee información suficiente para ser clasificadas e incorporadas a la lista del Comité de Nomenclatura de la IUBE. Bajo el epígrafe 3.1.21 se describen las endodesoxirribonucleasas que producen fosfomonoesteres 5'. Estas comprenden la desoxirribonucleasa I y similares, la desoxirribonucleasa IV y similares y las desoxirribonucleasas de restricción de tipo I, II y III. Mientras que las primeras cortan el ácido desoxirribonucleico (ADN) sin tener una especificidad de secuencia, los tres últimos grupos reconocen secuencias específicas en el ADN, cortando dentro o fuera de ellas. Una relación detallada de las nucleasas descritas en *Escherichia coli* y otros organismos procariotas y eucariotas se encuentra también en el trabajo de Linn et al. (Nucleases, Second Edition, Edited by S.M.Linn, R.S.Lloyd and R.J.Roberts, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). En este texto se citan también las nucleasas que se producen comercialmente así como sus aplicaciones más usuales en el laboratorio. Las nucleasas más utilizadas comercialmente son las endonucleasas de restricción de tipo II, de las cuales alrededor de 275 enzimas de este tipo son disponibles comercialmente en la actualidad (Bhagwat, A.S. Methods in Enzymol. 216, 199-224, 1992). Otras DNAsas, aún sin ser endonucleasas de restricción, han encontrado también un importante número de aplicaciones en ese tipo de estudios (como por ejemplo, la desoxirriboendonucleasa I de páncreas bovino, exonucleasas I y III de *E. coli*, nucleasa P1 de *Penicillium*, nucleasa S1 de *Aspergillus*, nucleasa Bal31 de *Alteromonas*, nucleasa S7 de *Staphylococcus aureus*, nucleasa de judía, fosfodiesterasas I de veneno de serpiente y III de bazo bovino), todas ellas presentes en los catálogos comerciales de las casas suministradoras.

Un estudio de las referencias bibliográficas publicadas posteriormente a las fechas indicadas antes nos ha mostrado que la situación en cuanto a los tipos y características de las nucleasas conocidas no ha variado sustancialmente de lo descrito. En las referencias bibliográficas individuales para cada enzima consultadas, se detallan tanto los métodos de purificación utilizados en cada caso como las características bioquímicas de las distintas nucleasas. Ninguno de esos procesos completos, tal y como se describen en las distintas publicaciones es aplicable para purificar satisfactoriamente el enzima objeto de la patente por lo que hubo que desarrollar un esquema nuevo. La amplia base documental disponible, además de la comunicación personal con algunos de los autores de los trabajos científicos mencionados antes, a través de congresos, reuniones y proyectos con-

juntos, nos ha permitido en primer lugar tener una perspectiva clara del estado de la técnica anterior a nuestros trabajos en cuanto a la existencia y características de las nucleasas conocidas hasta la fecha y en segundo lugar el desarrollo de un proceso específico de purificación de 12 nucleasa de *Streptomyces antibioticus* estudiada por nosotros y su caracterización posterior. Estos puntos se resumen a continuación.

- 1.- La nucleasa de *S. antibioticus* ha sido aislada siguiendo etapas particulares y procedimientos concretos descritos previamente por otros autores para varias de la nucleasas citadas arriba, ya que, como hemos mencionado no existe un proceso general de purificación aplicable a todas las nucleasas. De este modo, las condiciones de aplicación de cada paso específico de purificación (descritos detalladamente en la sección correspondiente) así como el orden de aplicación de estos procesos difieren de todos los publicados para otras nucleasas y por lo tanto el proceso en su conjunto se puede considerar original.
- 2.- El estudio detallado de las características de la nucleasa indicó que este enzima hidroliza ADN endonucleolíticamente dejando extremos terminados en 3'-OH y 5'-P (se detalla en la sección descriptiva), por lo que se incluye, junto con otras nucleasas, dentro del grupo EC 3.1.21 del Comité Internacional de Nomenclatura de la IUB, citado arriba. El enzima, como detallaremos en otra sección, requiere Mg^{2+} lo cual es común para las endonucleasas de restricción de tipo I, II y III, incluidas en ese mismo grupo. Lo que distingue claramente la nucleasa aislada por nosotros del resto de los enzimas de ese grupo es que el enzima de *S. antibioticus* muestra una preferencia de corte hacia regiones concretas del ADN (de tres o mas guaninas contiguas; detallado en la sección de descripción), sin que la especificidad llegue a ser tan estricta como en el caso de las nucleasas de tipo I, II ó III ya mencionadas. Esta peculiaridad le distingue también del resto de nucleasas de otros grupos, denominadas "inespecíficas" por no reconocer secuencias de bases determinadas para la hidrólisis. Solamente existe un grupo de nucleasas, aisladas de mitocondrias y núcleos de tejidos bovino y de rata (Low, R.L., Cummings, O.W. and King, T.C. J. Biol. Chem. 262, 16164-16170, 1987; Ruiz-Carrillo, A. and Renaud, J. EMBO J. 6, 401-407, 1987; Low, R.L., Buzan, J.M. and Couper, C.L. 16, 6427-6445, 1988; Gottlieb, J. and Muzyczka, N. J. Biol. Chem. 265, 10842-10850, 1990) que presentan una cierta analogía con el enzima de *S. antibioticus*. Estas semejanzas se refieren a la hidrólisis preferente del ADN en regiones $(dG)_n \cdot (dC)_n$, la producción de fragmentos con terminaciones 5'-fosfomonoester y el requerimiento de Mg^{2+} para la hidrólisis. Sin embargo, existen diferencias claras: las re-

giones (dG)_n.(dC)_n cortadas deben ser iguales o mas largas que 9 residuos seguidos (lo que no ocurre con nuestro enzima) y la cadena de citosina es cortada (tampoco sucede en nuestro caso).

Descripción del invento

Se ha elaborado un proceso de purificación a homogeneidad de la endonucleasa detectada previamente por nosotros en la cepa anterior de *S. antibioticus*. El análisis posterior de este enzima una vez purificado puso en evidencia que poseía una especificidad de corte en el substrato (ADN) no descrita anteriormente. Este enzima (que denominamos endonucleasa de *Streptomyces antibioticus*) se clasifica, según se ha justificado en la sección previa, dentro de la subclase EC 3.1.21.-según el Comité de Nomenclatura de la IUB (Enzyme Nomenclature, 1984, IUB. Academic Press, Inc.). Así pues, tanto el proceso de purificación como las características del enzima, constituyen los objetos de la patente.

El proceso de purificación fue llevado a cabo a 4°C. Es necesario seleccionar previamente el medio de producción del enzima, ya que la producción de la nucleasa está sujeta a regulación nutricional, lo cual hace que se sintetize en unos medios de cultivo, pero no en otros (De los Reyes-Gavilán, C.G., Aparicio, J.F., Barbés, C., Hardisson, C. and Sánchez, J. J. Bacteriol. 170, 1339-1345, 1988; De los Reyes-Gavilán, C.G., Cal, S., Barbés, C., Hardisson, C. and Sánchez, J. J. Gen Microbiol. 137: 299-305, 1990t. El medio de producción utilizado para el enzima fue GAE (glucosa 1%, L-asparagina 0.1%, extracto de levadura 0.05%, PO₄HK₂ 0.05%, SO₄Mg.7H₂O 0.05%, FeCl₂.4H₂O 0.001%). Se inocularon con una suspensión densa de esporas matraces de 2 litros con 200 ml del medio anterior, incubándose a 30°C en agitador orbital a 200 rpm durante al menos 24 horas. Una vez desarrolladas las células, estas constituyeron el material de partida para el proceso de purificación, ya que la nucleasa no se excreta en cantidad apreciable al medio de cultivo. 150 gr de micelio de *S. antibioticus* se re-suspendieron en 600 ml de una solución conteniendo 10mM tampón fosfato (pH 7.0), 1 mM 1,4-Ditiotreitol (DTT), 1mM EDTA (ácido etilen diamino tetraacético), 0.1mM fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), 1mM N₃Na (tampón A) y 0.2M NaCl. Las células se rompieron en una French Pressure Cell Press (SLM & Aminco Instruments, Urbana, II) y se sometieron a sonicación a 14 μm de frecuencia durante períodos de 30 segundos, hasta su ruptura completa. El micelio roto fue ultracentrifugado a 40000 xg durante 1 hora y el sobrenadante se utilizó como fuente del enzima para su posterior purificación, según las siguientes etapas:

Etapa 1: Cromatografía en Fosfocelulosa- La columna (5.2x9.2 cm, 200 ml, Whatman Biosystems, Maidstone, England) se preparó según Greene P.J. et al. (Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D.J., Tait, R. and Boyer, H.W. Nucleic Acids Res. 5,

2373-2381. Nucleic Acids Res. 5, 2373-2381, 1978). Después de aplicar el extracto enzimático (970 mg de proteína y 23500 unidades de enzima, flujo de 100 ml/hora) a la columna de fosfocelulosa equilibrada con tampón A más 0.4M NaCl, esta se lavó con 1 litro del mismo tampón antes de eluir con una solución única de 0.8M NaCl, recogiendo aproximadamente 175 ml de solución enzimática activa (31.5 mg de proteína, 34200 unidades).

Etapa 2: Cromatografía de afinidad en Cibacron Blue F3-GA Sepharose- El pico de actividad de la columna de fosfocelulosa se diluyó con 325 ml de 30.77mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.18M NaCl; 7mM 2-mercaptoetanol; 0.1 mM PMSF (concentración final de 20mM Tris-HCl, 3.5mM fosfato; tampón B) y se aplicó a una columna de Cibacron Blue Sepharose (3x13 cm, 20ml, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden), equilibrada previamente con 200ml de tampón B, que acabamos de describir, más 0.4M NaCl, a un flujo de 29 ml/hora. Las proteínas se eluyeron con una solución de tampón B más 0.9M NaCl.

Etapa 3: Cromatografía de afinidad en ADN-Celulosa- El eluyente activo (aproximadamente 100ml) de la columna anterior se dializó frente a tampón B (cuya composición se detalla en la Etapa 2) más 0.1M NaCl y se aplicó a una columna de ADN (cadena doble)-celulosa (1x10 cm, 7ml, Sigma Chemical Company) equilibrada previamente con el mismo tampón, a un flujo de 9 ml/hora. El enzima se eluyó con 30 ml de un gradiente lineal de 0.1-1M NaCl. Las fracciones conteniendo la actividad enzimática eluyen a 0.13M NaCl. El volumen final de las fracciones unidas fue de 5.1 ml (8.2 mg proteína, 17300 unidades).

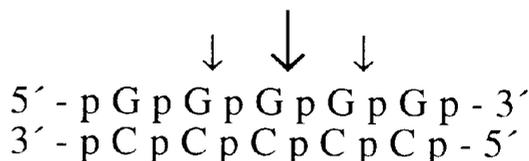
Etapa 4: Cromatografía FPLC de intercambio catiónico- El conjunto de fracciones activas de la etapa anterior se aplicó a una columna Mono S HR 5/5 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden) conectada a un sistema cromatográfico automático de FPLC (Pharmacia), equilibrada previamente con 44mM Hepes/KOH, pH 7.1, 7mM 2-mercaptoetanol, 1mM EDTA y 0.3M NaCl a un flujo de 1ml/min. El enzima se eluyó con 30 ml de un gradiente lineal de 0.3-1M NaCl en el mismo tampón. La actividad eluyó en un pico único a 0.69M NaCl, obteniéndose un total de 0.077 mg de proteína pura (9230 unidades). El conjunto de fracciones activas (conteniendo alrededor de 0.5M NaCl) se guardaron a -20°C en 44mM Hepes/KOH, pH 7.1, 30% glicerol y 10% DMSO.

La actividad de la nucleasa se ha ensayado por dos métodos alternativos. Para cuantificar las unidades totales obtenidas en los distintos pasos del proceso de purificación) se utilizó una modificación del método de Sadowski y Hurwitz (Sa-

dowski, P.D. and Hurwitz, J. J. Biol. Chem. 244, 6192-6198,19691 según se describe a continuación. La mezcla de reacción contenía 1 OmM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 7mM 2-mercaptoetanol (ó 1mM DTT), 100mM NaCl y 15µg de fago lambda (λ), circularizado con polinucleotido quinasa del fago T4 (Boehringer) como se describe en Hopwood et al. (Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrepf, H. Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, 1985). Después de incubar durante 30 minutos a 37°C, la reacción se detuvo calentando a 90°C durante 10 minutos. Se añadió agua (49µl) y el ADN se desnaturalizó hirviendo durante 5 minutos. La muestra se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se añadieron después 10µl de tampón de exonucleasa I (67mM glicina, pH 9.5, 10mM 2-mercaptoetanol y 6mM MgCl₂) y 1 unidad de exonucleasa I de *Escherichia coli*. La reacción se incubó durante 10 minutos a 37°C. Tras hervir durante 5 minutos, se añadió ácido tricloroacético (concentración final 10%) y se mantuvo la muestra en hielo durante 15 minutos. El precipitado resultante se centrifugó y se midió la absorbancia del sobrenadante a 260 nm. La actividad de la nucleasa se detecta como un incremento en la absorbancia obtenida en las condiciones descritas arriba. Una unidad de enzima es equivalente a un incremento de 0.5 en la absorbancia después del tratamiento con exonucleasa I. La actividad en las fracciones obtenidas de las distintas columnas cromatográficas se ensayó mediante visualización de los productos de degradación del ADN en geles de agarosa al 0.8%. ADN de λ (0.25µg) se incubó en 20,µl (volumen final) de tampón de reacción (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 7mM 2-mercaptoetanol ó 1mM DTT, 100mM NaCl) con un volumen adecuado de cada fracción (concentración final de NaCl 0.08-0.12M). La incubación se realizó a 37°C y las reacciones se detuvieron al cabo de 1 hora añadiendo 2.2,µl de una solución de paro (Sambrook et al. 1989; referencia citada anteriormente).

La caracterización del enzima purificado se describe a continuación. Las técnicas utilizadas han sido detalladas previamente por otros autores y se encuentran reseñadas en nuestros trabajos previos con otros enzimas (Aparicio, J.F., Hardisson, C. and Sánchez, J. Biochem. J. 281, 231-237, 1992; Aparicio, J.F., Freije, J.M.P., López-Otin, C., Cal, S. and Sánchez, J. Eur. J. Biochem. 205, 695-699, 1992). El enzima tiene una masa molecular de 29 kDa, siendo activo en forma monomérica, y un punto isoeléctrico de 7.8. La nucleasa hidroliza ADN nativo, lineal o circular, con una eficiencia 2.68 veces mayor que el ADN desnaturalizado. El pH óptimo es 7.5 y la concentración óptima de NaCl es de 100mM. El enzima actúa en un rango amplio de temperaturas, de 37°C a 50°C y su estabilidad mejora notablemente en presencia de 10% DMSO. El ion Mg²⁺ se requiere para la actividad siendo la concentración óptima de 10mM. Mn²⁺ puede reemplazar este catión, siendo la concentración óptima en

este caso de 5mM. Otros cationes (Ca²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, and Hg²⁺) no substituyen al Mg²⁺. Es necesario añadir 2-mercaptoetanol (7mM) o DTT (1mM) para que la actividad sea máxima. Hg²⁺ (5mM) o iodoacetato (10mM) inhiben la actividad. El enzima hidroliza el ADN por medio de cortes en cualquiera de las dos cadenas, con una fuerte preferencia por secuencias seguidas de tres o más guaninas (detallado más abajo). De esta forma se producen fragmentos de ADN cuando coinciden dos cortes muy próximos en ambas cadenas. Los fragmentos varían en tamaño (35 a 250 pares de bases aproximadamente) y pueden contener cadenas simples de varios nucleótidos no apareados. Los extremos producidos, identificados con los métodos descritos previamente (Aparicio, J.F., Freije, J.M.P., López-Otin, C., Cal, S. and Sánchez, J. Eur. J. Biochem. 205, 695-699, 1992) son 3'-OH y 5'-P. La identificación de los sitios de corte en el ADN por el enzima se llevó a cabo según el método de Brown y Smith (Brown,N.L. and Smith, M. Methods in Enzymology 65, 391-404, 1980), mediante experimentos de secuenciación enzimática (Sanger,F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467) en muestras paralelas idénticas de ADN en cadena doble de M13mp18, marcado radiactivamente (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY,1989), una de las cuales se sometió a la acción del enzima. También se analizaron los sitios de corte mediante secuenciación química en paralelo, de muestras idénticas a las cortadas por el enzima (Maxam, A.M. and Gilbert, W. Methods in Enzymology 65, 499-560, 1980). Por último, se sintetizaron polinucleótidos con una secuencia previamente definida, se marcaron radiactivamente (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y se utilizaron como sustratos del enzima. Las identidades químicas de los productos de digestión se asignaron mediante coelectroforesis de las marcas producidas por fosfodiesterasa de veneno de serpiente (Drew,H.R. J. Mol. Biol.176, 535-557, 1984) o mediante hidrólisis química de las guaninas según el método de Maxam y Gilbert citado arriba. Como resultado de todos estos análisis se evidenció que la nucleasa de *S. antibioticus* muestra una preferencia de corte en el ADN de cadena doble por regiones de tres o más guaninas, cortando mayoritariamente entre la tercera y la cuarta y minoritariamente entre la segunda y la tercera y entre la cuarta y la quinta, como se muestra en el esquema adjunto:



donde "p" es un residuo de fosfato, G es guanina y C es citosina. La cadena complement-

taria de citosinas, no es cortada. En ausencia de las secuencias citadas arriba, otras secuencias del tipo: d(GGG↓GA), d(GGG↓GC), d(GGG↓GT), d(GCG↓GN) (donde A es adenina, T, timina y N es cualquier base) son cortadas en la posición indicada por la flecha, aunque en menor proporción. También se observan cortes en d(GGG↓A), d(GTG↓G), d(GAG↓G), d(GGG↓T), d(GCG↓A) que disminuyen en intensidad cuando estas secuencias están próximas a las secuencias detalladas en primer lugar. Otros cortes minoritarios se observan en d(GC↓G), d(GC↓A), d(GG↓G), d(GC↓T), d(GG↓T).

Por lo expuesto aquí y en la sección anterior

(estado de la técnica) se muestra que la preferencia de corte del enzima hacia el ADN no se corresponde con la descrita previamente para ninguna otra nucleasa en la literatura científica, siendo su especificidad de hidrólisis del substrato de ADN, nueva. Por tanto, el interés de este enzima se centra en su aplicación como reactivo o instrumento de corte adicional a los ya existentes, en laboratorios que utilizan ADN de cualquier origen en el transcurso de su trabajo (por ejemplo, aquellos que realizan investigación en áreas de biología molecular e ingeniería genética), tanto de carácter básico como aplicado y en cualquier campo de la ciencia o actividad profesional.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

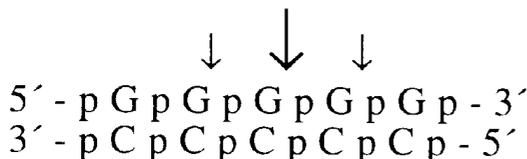
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una desoxirriboendonucleasa capaz de reconocer y cortar preferentemente en regiones de tres o más guaninas contiguas en ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena doble **caracterizada** porque los cortes mayoritarios se producen entre la tercera y la cuarta guanina y minoritariamente entre la segunda y la tercera y entre la cuarta y la quinta guanina, como se muestra en el esquema adjunto:



donde "p" es un residuo de fosfato, G es guanina y C es citosina. La cadena complementaria de citosinas, no es cortada.

2. Una desoxirriboendonucleasa tal y como se define en la reivindicación 1 que, en ausencia de la secuencia de corte preferente, corta otras secuencias del tipo: d(GGG↓GA), d(GGG↓GC), d(GGG↓GT), d(GCG↓GN), d(GGG↓A), d(GTG↓G), d(GAG↓G), d(GGG↓T), d(GCG↓A), d(GC↓G), d(GC↓A), d(GG↓G), d(GC↓T), d(GG↓T) (donde A es adenina, T, timina y N es cualquier base) correspondiendo el orden de las mismas a la preferencia mostrada por el enzima.

3. Una desoxirriboendonucleasa tal y como se define en las reivindicaciones 1 y 2, que posee las siguientes características:

a) masa molecular de 29 kDa

b) punto isoeléctrico de 7.8

c) pH óptimo de 7.5

d) concentración óptima de NaCl de 100mM

e) temperatura óptima de 37°C a 50°C

f) requerimiento de ión Mg²⁺ y 2-mercaptoetanol ó DTT

4. Una endonucleasa, como se define en las reivindicaciones 1, 2 y 3, producida por el microorganismo *Streptomyces antibioticus* CECT 3213.

5. Un proceso para producir y obtener la endonucleasa, definida en las reivindicaciones 1, 2 y 3 que comprende las siguientes fases: a) el cultivo de la cepa de *Streptomyces antibioticus* CECT 3213 en medios y condiciones de crecimiento específicos y b) la purificación del enzima.

6. Un método de purificación para obtener una endonucleasa, según se define en la reivindicación 5, que comprende diversos pasos cromatográficos específicos en columnas de fosfolulosa, Cibacron Blue F3-GA Sepharose, ADN-Celulosa y Mono S HR 5/5 de FPLC y que tiene como resultado la obtención del enzima libre de otros contaminantes de proteína.

7. Un reactivo que contiene la nucleasa de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 4 para ser utilizado en el campo de la biología molecular o ingeniería genética.

8. La utilización de la endonucleasa definida en las reivindicaciones 1 a 4 como reactivo para cortar ADN que contenga las secuencias reconocidas y cortadas por el enzima.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 9/22

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY. Vol. 170, nº 3. Marzo 1988. Pág. 1339-1345. C.G. DE LOS REYES-GAVILAN et al. "An Exocyttoplasmic Endonuclease with Restriction Function in Streptomyces antibioticus". * Todo el documento *	1-8
A	J. OF GENERAL MICROBIOLOGY. Vol. 136. 1991. Pág. 299-305. C.G. DE LOS REYES-GAVILAN et al. "Nutritional regulation of differentiation and synthesis of an exocyttoplasmic deoxyriboendonuclease in Streptomyces antibioticus". * Todo el documento *	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.09.95

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1