

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 697**

21 Número de solicitud: 201230697

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/78 (2006.01)

C12N 15/73 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

09.05.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.12.2013

Fecha de la concesión:

22.09.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

29.09.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (100.0%)

Cra. de Valldemossa, km 7,5

07071 Palma de Mallorca (Illes Balears) ES

72 Inventor/es:

CHRISTIE OLEZA, Joseph Alexander;

BRUNET GALMÉS, Isabel;

LALUCAT JO, Jorge;

NOGALES FERNÁNDEZ, Balbina y

BOSCH ZARAGOZA, Rafael

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Minitransposón miniUIB y usos derivados**

57 Resumen:

Minitransposón miniUIB y usos derivados.

La presente invención se refiere a un minitransposón que comprende las repeticiones invertidas izquierda y derecha de ISPst9, a su uso para la transferencia de un ácido nucleico o para la mutagénesis aleatoria. Así mismo, la presente invención se refiere a un método para la transposición de un ácido nucleico desde una bacteria dadora a una bacteria receptora que comprende introducir el ácido nucleico a transponer entre las repeticiones invertidas del minitransposón de la invención, introducir el minitransposón en la bacteria dadora y conjugar ambas bacterias dadora y receptora.

ES 2 433 697 B1

Minitransposón miniUIB y usos derivados**DESCRIPCIÓN**

- 5 La presente invención se refiere a un minitransposón denominado miniUIB y a su uso para la inserción genética. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biotecnología.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 Los sistemas de inserción genética basados en minitransposones han demostrado ser los más simples y rápidos para insertar fragmentos de ADN en el cromosoma de la célula hospedadora. Estas herramientas biotecnológicas consisten en una secuencia de ADN flanqueada por las repeticiones invertidas (IRs) del transposón. Estas IRs son reconocidas por la transposasa, enzima codificada fuera de la estructura móvil, que es la responsable de movilizar la estructura IR-IR a otra región de ADN en el mismo u otro replicón.
- 15 Dado que el gen de la transposasa no es movilizado con el minitransposón, el resultado final del proceso es una inserción de ADN estable.

- Los sistemas de minitransposición mini-Tn5 y mini-Tn10 (Herrero et al 1990 J. Bacteriol. 172:6557-6567; de Lorenzo et al 1990 J. Bacteriol. 172:6568-6572) son, con diferencia, los más usados. Sus aplicaciones biotecnológicas residen en la simplicidad de sus estructuras genéticas junto con el sistema de replicación de plásmido suicida R6K (Kolter et al 1978 Cell 15:1199-1208) acoplado al sistema de conjugación RP4 de las cepas *E. coli* λ_{pir} (Miller y Mekalanos 1988 J. Bacteriol. 170: 2575-2583, Herrero et al 1990). Desde entonces se les han introducido varias innovaciones de interés biotecnológico tales como el uso de nuevos determinantes de resistencia, la inserción de una replicasa R6K para facilitar la rápida
- 20 identificación de las regiones flanqueantes de la inserción (Rossignol et al 2001 Res. Microbiol. 152:481-485) o la introducción del gen *sacB* para facilitar la pérdida del marcador de resistencia a antibiótico por recombinación homóloga (Li et al 2009 J. Microbiol. Methods 79:220-226). A pesar de ello, la inestabilidad de las estructuras del minitransposón cuando se introduce un fragmento de ADN entre las IRs requiere del uso de plásmidos intermediarios para poder realizar correctamente las construcciones genéticas (Herrero et al 1990). Adicionalmente, en algunas cepas receptoras, las frecuencias de transposición del sistema son tan bajas como las tasas de co-integración por recombinación homóloga del vector (Herrero et al 1990).

- IS*Ppu12* es una secuencia de inserción (IS) que se describió por primera vez en el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2 (Williams et al 2002 J. Bacteriol. 184:6572-6580). Más adelante, se describió su presencia en *P. stutzeri* AN10 (Christie-Oleza et al 2010 J. Bacteriol. 192:1423-1432) y cómo esta IS era responsable de la fuerte activación de la transposición de las dos ISs de tipo IS*L3* (IS*Ppu12* y IS*Pst9*) en la mayor parte de las células de *P. stutzeri* AN10 que sufrían un proceso de interacción conjugativa (Christie-Oleza et al 2009 J. Bacteriol. 191:1239-1247). En este sentido, se demostró que el
- 35 incremento de la transposición estaba regulado por TnpR, el regulador transcripcional codificado en el elemento IS*Ppu12*. La activación de TnpR después de la conjugación incrementaba la transcripción del gene *tnpA*. La proteína sintetizada TnpA debería ser la responsable de la transposición de las dos ISs, IS*Ppu12* y IS*Pst9*, ambas flanqueadas por IRs similares (Christie-Oleza et al 2010).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción génica que comprende las repeticiones invertidas izquierda y derecha de la secuencia de inserción IS*Pst9* de *Pseudomonas stutzeri*.

- 50 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la construcción génica del primer aspecto de la invención para la transferencia de una secuencia nucleotídica de interés.

- En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la construcción génica del primer aspecto de la invención para la mutagénesis aleatoria.

- 55 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para la transposición de un ácido nucleico que comprende las siguientes etapas: (a) introducir el ácido nucleico a transponer entre las repeticiones invertidas de la construcción génica del primer aspecto de la invención; (b) introducir el ácido nucleico resultante de la etapa (a) en una bacteria dadora; y, (c) inducir la conjugación de la bacteria dadora con una bacteria receptora.
- 60

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención supone una nueva herramienta biotecnológica que permite la transposición de material genético entre dos células del dominio *Bacteria*. Esta herramienta es un minitransposón, que los inventores han denominado miniUIB. El minitransposón miniUIB presenta una alta eficiencia de transposición y es capaz de transponer secuencias de muy distintos tamaños, desde secuencias pequeñas de unos 500 pares de bases (pb) hasta secuencias grandes de hasta 12 kilobases (kb). Además, la transposición conseguida gracias a miniUIB es una transposición estable. Esto implica que para insertar secuencias mayores a 12 kb se podría repetir el proceso tantas veces como sea necesario.

Los inventores han encontrado que el minitransposón miniUIB (construido a partir de las secuencias IRs de *ISPst9* y basado en la transposición de la secuencia de inserción (IS) *ISPpu12*) es altamente eficaz a la hora de transponer de manera estable grandes fragmentos de ADN en cepas de *P. stutzeri* y en otras especies. Además, el minitransposón miniUIB mejora la eficiencia de transposición en comparación con el minitransposón mini-Tn5, el más comúnmente empleado hasta la fecha, y es útil en la transposición de material genético en una mayor variedad de bacterias que el mini-Tn5.

Los inventores han demostrado que el miniUIB es efectivo para conseguir la inserción de grandes fragmentos genéticos en un amplio rango de microorganismos receptores compatibles con el sistema de conjugación RP4.

En la presente descripción, los términos transposición y transferencia se usan indistintamente.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción génica que comprende las repeticiones invertidas izquierda y derecha de la secuencia de inserción *ISPst9* de *Pseudomonas stutzeri*. Preferiblemente, la repetición invertida izquierda comprende SEQ ID NO: 1 y la repetición invertida derecha comprende SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, la repetición invertida izquierda consiste en SEQ ID NO: 1 y la repetición invertida derecha consiste en SEQ ID NO: 2.

Se entiende por construcción génica una secuencia nucleotídica construida mediante ingeniería genética uniendo distintas secuencias nucleotídicas de manera que la secuencia nucleotídica de la construcción génica no está presente como tal en la naturaleza, sino que es artificial. Se conocen en el estado de la técnica diversos métodos para la obtención de dichas construcciones génicas. Entre ellos están el diseño de cebadores con secuencia específica, la PCR, el uso de enzimas de restricción, etc, todos ellos bien conocidos por el experto en la materia.

Las repeticiones invertidas o secuencias repetidas inversas de una secuencia de inserción son pequeñas secuencias nucleotídicas que flanquean dicha secuencia de inserción. La secuencia de inserción *ISPst9* de *Pseudomonas stutzeri* es una secuencia de inserción de tipo *ISL3*, y presenta dos repeticiones invertidas que flanquean la secuencia nucleotídica que codifica para la transposasa de dicha secuencia de inserción. Las secuencias de las dos repeticiones invertidas de *ISPst9* tienen 24 pb y son idénticas. La secuencia de la repetición invertida izquierda es SEQ ID NO: 1 y la de la derecha es SEQ ID NO: 2, teniendo en cuenta la secuencia 5'-3' de la construcción génica de la invención.

En una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la construcción génica comprende al menos una secuencia diana de una enzima de restricción entre las dos repeticiones invertidas izquierda y derecha. Preferiblemente, dicha construcción comprende un sitio de multiclonación (MCS) entre las dos repeticiones invertidas izquierda y derecha. Preferiblemente, el MCS comprende entre 1 y 20 dianas de distintas enzimas de restricción, más preferiblemente entre 1 y 10 dianas, aún más preferiblemente entre 1 y 5 dianas.

Una secuencia diana de una enzima de restricción es la secuencia de ADN reconocida por una enzima con actividad hidrolasa específica, llamada enzima de restricción, que es capaz de hidrolizar dicha secuencia de ADN en un sitio específico determinado por la secuencia diana. Las secuencias dianas suelen ser palíndromos y el corte de la enzima de restricción puede dejar extremos cohesivos o romos en la secuencia de ADN hidrolizada. Un MCS es una secuencia de ADN que contiene múltiples secuencias dianas de distintas enzimas de restricción de manera consecutiva. La utilidad de un MCS es que la secuencia de ADN puede hidrolizarse en una misma región con muchas enzimas alternativas, lo que permite poder elegir aquella que más convenga para la clonación en ese punto de otra secuencia de ADN de interés. El número de secuencias diana que tenga un MCS determina por un lado su versatilidad, si tiene muchas dianas de enzimas diferentes, pero por otro lado un número demasiado alto de dianas aumenta el riesgo de que una potencial secuencia de interés que se quiera introducir en el MCS, tenga en su secuencia alguna o varias de las dianas de las enzimas del MCS, que por tanto no podrían emplearse para la clonación de esta secuencia de interés. Por otro lado, mediante PCR se puede modificar la secuencia del MCS de manera que pueden eliminarse dianas o introducirse nuevas dianas, para así tener

un MCS a medida para cada estrategia.

En otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la construcción génica del primer aspecto de la invención comprende SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, dicha construcción consiste en
5 SEQ ID NO: 3. La construcción génica con SEQ ID NO: 3 es la secuencia del miniUIB empleado en los ejemplos de la presente invención, con todas sus variantes.

En otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la construcción génica del primer aspecto de la invención está flanqueada por dos dianas de enzimas de restricción, como por
10 ejemplo la secuencia esquematizada en la figura 1A. En una realización preferida, las dos dianas de enzimas de restricción son iguales. En otra realización preferida, las dos dianas de enzimas de restricción son distintas.

En otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la construcción génica del primer aspecto de la invención es un vector. Preferiblemente, dicho vector comprende un origen de replicación, al menos un gen de movilización, otro MCS y/o al menos un gen de resistencia a antibiótico. Preferiblemente, el origen de replicación es el *ori* del vector R6K. Preferiblemente, los genes de movilización son los genes *mob* del vector RP4. Preferiblemente, el gen de resistencia a antibiótico es el gen de resistencia a ampicilina (Ap^R). En una realización preferida del primer aspecto de la presente
15 invención, la construcción génica comprende SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, la construcción génica consiste en SEQ ID NO: 4.

Un vector es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente una vez han sido introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano o los vectores episomales de mamíferos. Otros vectores pueden integrarse en el genoma de la célula huésped y replicarse así junto con el genoma celular. Un origen de replicación es una secuencia de nucleótidos donde se forma una horquilla de replicación y donde se inicia la replicación del ADN. Un gen de movilización es un gen necesario para la transferencia de material genético en un proceso no sexual de conjugación bacteriana. El vector RP4 es un plásmido del grupo IncP capaz de transferir, replicar y
25 conservar material genético en la mayoría de géneros de bacterias Gram negativas.

El MCS del vector es distinto al MCS situado entre las repeticiones invertidas, de manera que las dianas de enzimas de restricción son reconocidas e hidrolizadas por distintas enzimas. Además, dichas dianas son preferiblemente únicas en la secuencia del vector. Este MCS adicional es útil para modificar el vector a conveniencia, ya que puede permitir modificar el gen de resistencia a antibiótico, introducir otro tipo de marcador (la secuencia codificante para una enzima, como por ejemplo la beta-galactosidasa, o la secuencia codificante para una proteína fluorescente, etc.).
40

Otra forma de modificar el gen de resistencia a antibiótico sería por ejemplo amplificar por PCR todo el vector menos el gen de resistencia a ampicilina, y después insertar en su lugar el gen de resistencia a otro antibiótico, como por ejemplo la kanamicina.
45

En una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la construcción génica comprende una secuencia nucleotídica de interés de entre 1 y 12.000 pares de bases, entre las repeticiones invertidas izquierda y derecha. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica de interés tiene entre 500 y 2.000 pares de bases.
50

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la construcción génica del primer aspecto de la invención para la transferencia de una secuencia nucleotídica de interés. Dicha transferencia ocurre entre una célula y otra, denominadas dadora y receptora, respectivamente. Preferiblemente, la transferencia de la secuencia nucleotídica de interés se hace en una célula del dominio *Bacteria* cuyo filo se selecciona entre: Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes. Preferiblemente, la Proteobacteria es de la clase Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria o Gammaproteobacteria. Más preferiblemente, la Proteobacteria es de la clase Gammaproteobacteria. Aún más preferiblemente, la Gammaproteobacteria es del género *Pseudomonas*. Por tanto, la célula receptora preferida es una Gammaproteobacteria, preferiblemente del género *Pseudomonas*.
55 60

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la construcción génica del primer

aspecto de la invención se usa para transferir un única copia de la secuencia de interés. Preferiblemente, esta única copia se transfiere a una célula de la Gammaproteobacteria *Escherichia coli*. La construcción del primer aspecto de la invención puede usarse por ejemplo para incrementar las posibilidades metabólicas de microorganismos como por ejemplo *E. coli*. Por ejemplo, mediante la construcción génica del primer aspecto de la invención se puede conseguir la introducción de genes en monocopia en *E. coli* u otras especies, para producir proteínas de interés biotecnológico que sean tóxicas para el productor cuando se producen en grandes cantidades.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la construcción génica del primer aspecto de la invención para la mutagénesis aleatoria. La construcción génica del primer aspecto de la invención es útil para la transferencia de una secuencia nucleotídica al cromosoma de la célula receptora. Además, esta transferencia se realiza de forma estable, es decir, la secuencia nucleotídica entre las repeticiones invertidas se inserta en el cromosoma de la célula receptora. Dicha inserción ocurre al azar, provocando así una mutación de inserción. La frecuencia de transferencia que permite la construcción génica de la invención puede ser elevada, lo que permite su uso para la mutagénesis aleatoria.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para la transposición de una secuencia nucleotídica de interés que comprende las siguientes etapas:

- a) introducir la secuencia nucleotídica de interés a transponer entre las repeticiones invertidas de la construcción génica del primer aspecto de la invención;
- b) introducir la construcción génica resultante de la etapa (a) en una bacteria dadora; y,
- c) inducir la conjugación de la bacteria dadora con una bacteria receptora.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la presente invención, la bacteria dadora es de la especie *Escherichia coli* y comprende la maquinaria de replicación del fago lambda. Preferiblemente, la bacteria dadora es *Escherichia coli* S17.1 λ_{pir} .

En una realización preferida del cuarto aspecto de la presente invención, la bacteria receptora es del género *Pseudomonas*, preferiblemente *Pseudomonas stutzeri*.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Mapas físicos y genéticos de la estructura miniUIB. Las estructuras genéticas se hallan en el plásmido pGP704. Los triángulos grises y blancos representan las IRs izquierda y derecha de *ISPst9* respectivamente. Se indican las dianas de restricción únicas (B, BglII; E, EcoRI; K, KpnI; M, SmaI; N, NdeI; R, EcoRV; S, SacI; X, XbaI). (A) miniUIB en pJOC21, (B) miniUIB-Km (1,6 kb) en pJOC22Km, (C) miniUIB-Cm (2,1 kb) en pJOC22Cm, (D) miniUIB-BC (3,6 kb) en pJOC22BC, (E) miniUIB-BC/Km (5,0 kb) en pJOC22BCKm, (F) miniUIB-KNG (7,0 kb) en pJOC22KNG, (G) miniUIB-Km/KNG (8,4 kb) en pJOC22KmKNG, (H) miniUIB-BC/Km/KNG (11,8 kb) en pJOC22BCKmKNG, (I) miniUIB en pJOC21b, (J) miniUIB-CHAP (2,4 kb) en pJOC28, (K) miniUIB-Km/CHAP (3,7 kb) en pJOC29, (L) miniUIB-ALKB (8,5 kb) en pALKB, (M) miniUIB-ALK (12,8 kb) en pALK, (N) miniUIB junto a *ISPpu12* IR-defectivo en pJOC100, (O) miniUIB-Km junto a *ISPpu12* IR-defectivo en pJOC100Km, y (P) miniUIB-ALK junto a *ISPpu12* IR-defectivo en pJOC100ALK.

Fig. 2. Transposición de miniUIB-Km en *P. stutzeri* AN10. (A, B) *Southern blot* del ADN genómico de *P. stutzeri* AN10 (wt) digerido con EcoRI y 10 derivados Km^R diferentes que han adquirido la estructura miniUIB-Km después de su conjugación con *E. coli* S17.1 λ_{pir} (pJOC22Km). (A) Detección de la adquisición de Km^R mediante su hibridación con la sonda KM. (B) Detección de las ISs de tipo ISL3 (*ISPst9* y *ISPpu12*) mediante su hibridación con la sonda TNPA. Los círculos blancos indican aquellas bandas que presentan *ISPpu12*, detectada mediante su hibridación con la sonda TNPR. Los asteriscos indican los carriles correspondientes a transconjugantes (3, 4 y 5) usados como test para la estabilidad de la inserción de miniUIBKm. (C) Frecuencias de la adquisición de Km^R por *P. stutzeri* AN10 después de la conjugación con *E. coli* S17.1 λ_{pir} (pJOC22Km) con diferentes tiempos de incubación.

Fig. 3. Análisis de la correlación entre las frecuencias de adquisición de los derivados de miniUIB por *P. stutzeri* AN10 después de la conjugación con *E. coli* S17.1 λ_{pir} que presenta diferentes derivados de pJOC21, usando derivados de miniUIB de diferentes tamaños. Los círculos y las barras de error indican el

promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los porcentajes revelan la frecuencia de adquisición del plásmido completo, evaluado por la adquisición del fenotipo Ap^R de los transconjugantes aislados. La línea discontinua indica la frecuencia de la adquisición del plásmido pGP704Km completo por *P. stutzeri* AN10 después de su conjugación con *E. coli* S17.1λ_{pir} (pGP704Km).

Fig. 4. Crecimiento de *P. stutzeri* AN10 (puntos blancos) y de su derivado *P. stutzeri* AN10-CHAP (puntos negros) en medio líquido LB a 4 °C. Los datos muestran el promedio y la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Fig. 5. Degradación de alcano por *P. stutzeri* AN10 y sus derivados que contienen la estructura miniUIB-ALK. (A) Hibridación del *Southern blot* con la sonda ALK frente al ADN genómico digerido con EcoRI de *P. stutzeri* AN10 (WT) y 8 derivados AN10-ALK diferentes que adquieren la estructura miniUIB-ALK después de la conjugación con *E. coli* S17.1λ_{pir} (pALK). El punto blanco destaca la única banda que contiene el plásmido pALK entero, detectado por hibridación mediante la sonda PGP. Los asteriscos señalan los transconjugantes (3, AN10-ALK3 y 8, AN10-ALK8) utilizados para evaluar la adquisición del fenotipo degradador de alcano. (B) Crecimiento (DO₆₀₀, densidad celular máxima) de *P. stutzeri* AN10, AN10-ALK3 y AN10-ALK8 en medio MBM suplementado con n-octano (barras negras), n-hexadecano (barras grises) y la mezcla de ambos n-alcenos (barras blancas). Los datos muestran el promedio y la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Fig. 6. Hibridación de *Southern blot* con la sonda KM frente a ADN genómico digerido con EcoRI obtenido de 8 derivados Km^R diferentes de *P. stutzeri* AN11 que han adquirido la estructura miniUIB-Km después de su conjugación con *E. coli* S17.1λ_{pir} (pJOC100Km).

Fig. 7. Comparación de la frecuencia de transposición de miniUIB-Km y miniTn5-Km1 en cincuenta aislados ambientales filogenéticamente diferentes. El árbol filogenético (dendrograma de *Neighbour joining* basado en la matriz de distancias *Jukes-Cantor* del ARN ribosómico 16S) muestra las relaciones entre las cepas tipo de cada uno de los géneros representados. La primera columna (aislados) indica el número de aislados utilizados para cada uno de los géneros (27 géneros). Las segunda y tercera columnas indican el número de aislados que adquirieron el fenotipo Km^R de miniUIB-Km y miniTn5-Km1 respectivamente después de su conjugación. Los puntos (frecuencia de la adquisición de Km^R de miniUIB-Km por la obtenida con miniTn5-Km1) sólo se calcularon para los 30 aislados capaces de recibir ambos minitransposones. Los círculos negros representan los 22 aislados que presentan mejores frecuencias para miniUIB-Km que para miniTn5-Km1. Los círculos blancos indican los 8 aislados con frecuencias mayores para miniUIB-Tn5 que para miniUIB-Km. Los círculos grises indican los valores obtenidos para *P. stutzeri* AN11 (1), *P. stutzeri* IS⁻ (2), y *K. pneumoniae* CMD1 (3).

Fig. 8. Degradación de alcano por *P. stutzeri* AN11 y su derivado que presenta la estructura miniUIB-ALK. (A) Hibridación de *Southern blot* con la sonda ALK frente a ADN genómico digerido con EcoRI de *P. stutzeri* AN11 (WT) y 10 derivados AN11-ALK diferentes que han adquirido la estructura miniUIB-ALK después de su conjugación con *E. coli* S17.1λ_{pir} (pJOC100ALK). Los asteriscos indican los transconjugantes (3, AN11-ALK3 y 4, AN11-ALK4) utilizados para evaluar el crecimiento en alcano. (B) Crecimiento (DO₆₀₀, densidad celular máxima) de *P. stutzeri* AN11, AN11-ALK3, y AN11-ALK4 en medio MBM suplementado con n-octano (barras negras), n-hexadecano (barras grises) y una mezcla de ambos n-alcenos (barras blancas). Los datos muestran el promedio y la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia del minitransposón de la invención así como las ventajas que éste presenta en comparación con otros minitransposones ya conocidos y comúnmente usados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medio y condiciones de cultivo. Las cepas de *P. stutzeri* AN10 (Ap^s, Cm^s, Km^s, Sm^s, nah⁺, alk, IS_{Ppu12}⁺) y AN11 (Km^s, nah⁺, alk, IS_{Ppu12}⁺) (García-Valdés y col 1988 Appl. Environ. Microbiol. 54:2478-2485), *Klebsiella pneumoniae* CMD1 (van de Klundert y col 1988 Infect. Dis. 7:776-778), y *P. putida* IS⁻ —un derivado defectivo en IS_{Ppu12} de *P. putida* mt-2 (Williams y Murray 1974 J. Bacteriol. 120:416-423) obtenida en nuestro laboratorio— han sido usadas como recipientes de los minitransposones utilizados en el presente estudio. También fueron usados cincuenta aislados ambientales filogenéticamente distintos obtenidos de una playa contaminada después del derrame de petróleo del *Prestige* (Galicia, España) (Christie-Oleza y col 2008 Int. Microbiol. 11:101-110). *E. coli* S17.1

λ_{pir} (Herrero y col 1990) fue usada para el alojamiento del plásmido pGP704 (Miller y Mekalanos 1988) y sus derivados (Tabla 1A), y para las conjugaciones basadas en RP4. Las conjugaciones fueron llevadas a cabo como se describió previamente (Christie-Oleza y col 2009). *Oleispira antarctica* DSM14852 (Yakimov y col 2003 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:779-785) fue usada como fuente para el gen de chaperonina (*cpn*). *P. putida* TF4-1L (GPO1) (Schwartz 1973 Appl. Microbiol. 25:574-577) fue usada como fuente para los determinantes génicos de degradación de alcanos (*alkBFGHJKL* y *alkST*). Si no se especifica lo contrario, las cepas fueron crecidas en caldo Luria-Bertani (LB) a 30° C. Para la selección de transconjugantes se usó medio Mineral Basal (MBM) (Aragno y Schlegel 1981 *The Prokaryotes*, vol 1. pp. 864-893, Springer-Verlag) suplementado con succinato 0,5% (peso/volumen) y los antibióticos necesarios (Ampicilina (Ap), 100 µg/ml; Kanamicina (Km), 50 µg/ml; Cloranfenicol (Cm), 40 µg/ml; y/o Estreptomicina (Sm), 50 µg/ml). Para crecer las cepas *alk*⁺ se usó MBM suplementado con n-octano (2% peso/volumen) y n-hexadecano (2% peso/volumen).

Manipulaciones de ADN. Todas las manipulaciones de ADN fueron realizadas como se describió previamente (Christie-Oleza y col 2009; Christie-Oleza y col 2010). Las digestiones por endonucleasas de restricción (*Roche* y *GE Healthcare*) así como las ligaciones con la ADN ligasa T4 (*Invitrogen*) fueron realizadas tal y como recomienda el fabricante. Las amplificaciones por PCR fueron realizadas mediante la ADN polimerasa *Taq* (*GE Healthcare*). El ADN plasmídico fue aislado por lisis alcalina mediante el *kit QIAprep Spin Miniprep* (*Qiagen*). En las hibridaciones en *Southern* se usó un marcaje directo por quimioluminiscencia (*ECL direct nucleic acid labeling and detection system*; *GE Healthcare*). La formación de círculos intermedios durante la transposición de *ISPpu12*, *ISPst9* y sus derivados fue evaluada tal y como se describió previamente (Christie-Oleza y col 2010).

Los cebadores y las sondas usados en el presente estudio son citados en las Tablas 1B y 1C. Las sondas, sus correspondientes dianas, así como el procedimiento a seguir para su síntesis se describe a continuación: TNPA, para la detección de genes *tnpA* tanto de *ISPst9* como de *ISPpu12*, obtenida como se describió anteriormente (Christie-Oleza y col 2009); TNPR, para la detección de genes *ISPpu12*, obtenida como se describió anteriormente (Christie-Oleza y col 2010); KM, para la detección de genes *Km*^R, obtenida mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores KM-F y KM-R en el plásmido pCSI2 (Elhai y Wolk 1988 Gene 68:119-138); ALK, para la detección de *alkBFGH*, obtenida mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores ALK1-F y ALK1-R en el ADN genómico obtenido de *P. putida* TF4-1L (GPO1); y PGP, para la detección de pGP704, obtenida mediante marcaje directo de la digestión con *EcoRI* del plásmido.

Plásmidos y construcciones derivadas de miniUIB en este estudio. Los plásmidos usados en este estudio se citan en la Tabla 1A. El plásmido pJOC21 (SEQ ID NO: 4), que contiene la estructura génica básica de miniUIB (SEQ ID NO: 3) (Fig. 1A), fue obtenido mediante la inserción de dos IRs (repetición invertida izquierda (IRL, SEQ ID NO: 1) y repetición invertida derecha (IRR, SEQ ID NO: 2)) de *ISPst9* en pGP704. IRR fue primero amplificado mediante PCR usando los cebadores PCR1F y PCR1R en el ADN genómico de *P. stutzeri* AN10. El producto de PCR resultante fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *EcoRI* y clonado entre las dianas de restricción de *SacI* y *EcoRI* en el plásmido pGP704. Posteriormente, IRL fue obtenido mediante amplificación por PCR usando los cebadores PCR3F y PCR3R y clonado entre las dianas de restricción de *BglII* y *XbaI*.

Diverso material génico fue clonado entre las IRs de pJOC21 dando los derivados de miniUIB representados en la Figura 1. Los plásmidos pJOC22Km, que contiene miniUIB-Km (Fig. 1B), y pJOC22Cm, con miniUIB-Cm (Fig. 1C), fueron obtenidos mediante la clonación de los determinantes *Km*^R y *Cm*^R de los plásmidos pCSI2 y pCSI1 respectivamente (Elhai y Wolk 1988), en las dianas de restricción de *XbaI* (*Km*^R) o *EcoRV* (*Cm*^R) de pJOC21. El plásmido pJOC22BC, que contiene miniUIB-BC (Fig. 1D), fue obtenido mediante clonación del fragmento linealizado de *SmaI* del vector de clonación pBCSK(-) (*Cm*^R, *Stratagene*) en la diana de restricción de pJOC21. El plásmido pJOC22BCKm, que contiene miniUIB-BCKm (Fig. 1E), fue obtenido mediante clonación del determinante *Km*^R de pCSI2 en la diana de restricción de *XbaI* en pJOC22BC. El plásmido pJOC22KNG, que contiene miniUIB-KNG (Fig. 1F), fue obtenido mediante clonación del fragmento linealizado con *SmaI* del plásmido pKNG101 (*Sm*^R, Kaniga y col. 1991 Gene 109:137-141) entre las dianas de restricción de *SmaI* y *EcoRV* de pJOC21. El plásmido pJOC22KmKNG, que contiene miniUIB-KmKNG (Fig. 1G), fue obtenido mediante clonación del determinante *Km*^R de pCSI2 en la diana de restricción para *XbaI* de pJOC22KNG. El plásmido pJOC22BCKmKNG, que contiene miniUIB-BCKmKNG (Fig. 1H), fue obtenido mediante clonación del fragmento linealizado con *SmaI* del vector de clonación pBCSK(-) en la diana de restricción de *SmaI* en pJOC22KmKNG.

El plásmido pJOC21b, que contiene la diana de restricción de *NdeI* defectiva, y la estructura miniUIB (Fig. 1I), fue obtenido del mismo modo que pJOC21 pero usando como cebador PCR3Rb en vez de PCR3R.

- para la amplificación de IRL. El promotor de la chaperonina de *P. stutzeri* AN10 (P_{hsp}), incluyendo la secuencia Shine-Dalgarno y el codón ATG, fueron amplificados usando los cebadores HSP-F y HSP-R y clonados en las dianas de restricción de XbaI y KpnI de pJOC21b. Con estos cebadores fue introducida una nueva diana de restricción para NdeI, para clonar más de una secuencia codificante para ser expresada correctamente desde el promotor P_{hsp} . A continuación, el gen de la chaperonina (*cpn*) de *O. antarctica* fue amplificado mediante los cebadores CPN-F y CPN-R y clonado entre las dianas de restricción de NdeI y SacI, obteniéndose el plásmido pJOC28 que contiene la estructura miniUIB-CHAP (Fig. 1J). Finalmente, el determinante Km^R de pCSI2 fue insertado en la diana de restricción de XbaI, obteniéndose el plásmido pJOC29 que contiene el minitransposón miniUIB-KmCHAP (Fig. 1K).
- El plásmido pALK, que contiene el minitransposón miniUIB-ALK (Fig. 1M) con los determinantes *alkST* y *alkBFGHJKL* de *P. putida* TF4-1L (GPo1), fue construido en tres pasos. Primero, los determinantes *alkBFGH* fueron insertados entre las dianas de restricción de XbaI y SacI de pJOC21, después de la amplificación por PCR mediante los cebadores ALK1-F y ALK1-R. Posteriormente los genes *alkJKL* fueron amplificados por PCR mediante los cebadores ALK2-F y ALK2-R y clonados en la diana de restricción de SacI, obteniéndose el plásmido pALKB que contiene el minitransposón miniUIB-ALKB (Fig. 1L). Finalmente, el operón regulador *alkST* fue amplificado mediante los cebadores ALKR_{sma}-F y ALKR_{sma}-R, e insertado en la diana de restricción de SmaI de pALKB, obteniéndose el plásmido pALK (Fig. 1M).
- Los plásmidos pJOC100 (Fig. 1N) y pJOC100ALK (Fig. 1P), contienen la maquinaria de transposición de *IS_{Ppu12}* sin las IRs, fueron obtenidos mediante amplificación por PCR de *IS_{Ppu12}* libre de IRs de *P. stutzeri* AN10 con los cebadores ISPPU-25F-eco y ISPPU-3348R-eco seguido de su clonación en la diana de restricción de EcoRI de pJOC21 y pALK, respectivamente. El plásmido pJOC100Km (Fig. 1O) fue obtenido después de la clonación de Km^R de pCSI2 en la diana de restricción de EcoRV de pJOC100.

Tabla 1A. Plásmidos.

Plásmidos	Descripción	Fuente
pBBR1MCS-1	Cm^R ; vector de clonación de amplio espectro de hospedadores	Kovach et al 1994 Biotechniques 16:800-802
pBC SK(-)	Cm^R ; <i>ori</i> pBBR322	Stratagene
pCSI1	Ap^R , Cm^R ; fuente del gen Cm^R usado en este estudio	(Elhai y Wolk 1988)
pCSI2	Ap^R , Km^R ; fuente del gen Km^R usado en este estudio	(Elhai y Wolk 1988)
pGP704	Ap^R ; <i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RP4	(Miller y Mekalanos, 1988)
pGP704Km	Ap^R , Km^R ; derivado de pGP704 portador del gen Km^R en el sitio EcoRI de su MCS	La presente invención
pKNG101	Sm^R ; <i>ori</i> R6K, <i>mob</i> RK2	(Kaniga et al 1991)
pJOC21	Ap^R ; derivado de pGP704 portador de miniUIB (IRL-MCS-IRR de <i>IS_{Pst9}</i>)	La presente invención
pJOC21b	Ap^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIBb (miniUIB defectivo en el punto de corte NdeI del MCS)	La presente invención
pJOC22Km	Ap^R , Km^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-Km (1,6-kb, IRL-Km ^R -IRR)	La presente invención
pJOC22Cm	Ap^R , Cm^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-Cm (2,1-kb, IRL-Cm ^R -IRR)	La presente invención
pJOC22BC	Ap^R , Cm^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-BC (3,6-kb, IRL-pBC SK-IRR)	La presente invención
pJOC22KmBC	Ap^R , Cm^R , Km^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-KmBC (5,0-kb, IRL-Km ^R -pBC SK-IRR)	La presente invención
pJOC22KNG	Ap^R , Sm^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-KNG (7,0-kb, IRL-pKNG101-IRR)	La presente invención
pJOC22KmKNG	Ap^R , Km^R , Sm^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-KmKNG (8,4-b, IRL-Km ^R -pKNG101-IRR)	La presente invención
pJOC22BCKmKNG	Ap^R , Km^R , Sm^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-BCKmKNG (11,8-kb, IRL-pBC SK-Km ^R -pKNG101-IRR)	La presente invención
pJOC28	Ap^R ; derivado de pJOC21b portador de miniUIBb-CHAP (2,4-kb, IRL- <i>P_{hsp}-cpn</i> -IRR)	La presente invención
pJOC29	Ap^R , Km^R ; derivado de pJOC21b portador de	La presente

	miniUIBb-KmCHAP (3,7-kb, IRL-Km ^R - <i>Phsp-cpn</i> -IRR)	invención
pALKB	Ap ^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-ALKB (8,5-kb, IRL- <i>alkBFGHJKL</i> -IRR)	La presente invención
pALKC-Cm	Ap ^R , Cm ^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-ALKC/Cm (6,4-kb, IRL-Cm ^R - <i>alkST</i> -IRR)	La presente invención
pALK	Ap ^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB-ALK (12,8-kb, IRL- <i>alkST-alkBFGHJKL</i> -IRR)	La presente invención
pJOC100	Ap ^R ; derivado de pJOC21 portador de miniUIB100 (IRL-MCS-IRR- <i>ISPPu12</i> sin IRs)	La presente invención
pJOC100Km	Ap ^R , Km ^R ; derivado de pJOC100 portador de miniUIB100-Km (IRL-Km ^R -IRR- <i>ISPPu12</i> sin IRs)	La presente invención
pJOC100ALK	Ap ^R ; derivado de pJOC100 portador de miniUIB100-ALK (IRL- <i>alkST-alkBFGHJKL</i> -IRR- <i>ISPPu12</i> sin IRs)	La presente invención

Tabla 1B. Cebadores.

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia 5'-3'
KM-F	SEQ ID NO: 5	AAA CGT CTT GCT CGA GGC C
KM-R	SEQ ID NO: 6	GGA GAA AAC TCA CCG AGG C
ALK-F	SEQ ID NO: 7	AAT CTA GAT TTC CAG CAG ACG ACG GAG C
ALK-R	SEQ ID NO: 8	CGC GCC GAG CTC CAG CGT TGT CC
PCR3-F	SEQ ID NO: 9	GAG ATC TTC GGG TAT GCG GAT TTA ATG
PCR3-R	SEQ ID NO: 10	GAT CTA GAC CCG GGC TAT TGT CAA GAC AG
PCR3-Rb	SEQ ID NO: 11	AGT CTA GAC CCG GGC TAT AGG GAA GGG GAT C
PCR1-F	SEQ ID NO: 12	CAG GTA CCG CAT GAC CGA AAT GCC CGA
PCR1-R	SEQ ID NO: 13	GGA ATT CGT GGG TAT GCG GAT TTA ATG G
HSP-F	SEQ ID NO: 14	GTC TAG ATT GAA CGC CCG CAT GTA G
HSP-R	SEQ ID NO: 15	GGG TACC ATA TGC GAT CTC TCC TAG TAG
CPN-F	SEQ ID NO: 16	CCA TAT GAA AAT CCG TCC ATT ACA TG
CPN-R	SEQ ID NO: 17	CGA GCT CAC GGT AAG CAG ATC AG
ALK2-F	SEQ ID NO: 18	GGC GAG TAC CAG GAC GGC GTA GGG
ALK2-R	SEQ ID NO: 19	TTG AGC TCT TAG AAA ACA TAT GAC GCA CC
ALKRsma-F	SEQ ID NO: 20	AAC CCG GGG CAC GTA CGG AGT GCG GG
ALKRsma-R	SEQ ID NO: 21	AAC CCG GGG GCG AAG GCC GAA GTC GGC
ISPPU25Eco-F	SEQ ID NO: 22	TTG AAT TCT TAC CTT TGC ATG AGA GTG AG
ISPPU3348Eco-R	SEQ ID NO: 23	TTG AAT TCG GGG CAC CTT CAC CCC ATC

5 Tabla 1C. Sondas.

Sondas	Descripción	Fuente
TNPA	<i>tnpA</i> de <i>ISPst9</i> y <i>ISPPu12</i>	(Christie-Oleza et al 2009)
TNPR	<i>tnpR</i> de <i>ISPPu12</i>	(Christie-Oleza et al 2010)
KM	gen Km ^R de pCSI2, PCR usando cebadores KM-F y KM-R	La presente invención
ALK	genes <i>alkBFGH</i> de <i>P. putida</i> TF4-1L (GPo1), PCR usando cebadores ALK1-F y ALK1-R	La presente invención
PGP	plásmido pGP704 completo digerido con EcoRI	La presente invención

Ejemplo 1: La actividad de transposición de *ISPPu12* tiene un efecto en *trans* sobre las estructuras genéticas flanqueadas por IRs de tipo *ISPPu12*.

10

El minitransposón miniUIB, derivado de *ISPPu12*, fue diseñado para explorar la actividad en *trans* de *ISPPu12* sobre estructuras genéticas flanqueadas por IRs similares a las encontradas en el transposón (Fig. 1A). La estructura miniUIB fue construida en el plásmido suicida pGP704 dando como resultado el plásmido pJOC21. Para seguir fácilmente su movilización, el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pCSI2 se clonó entre las IRs, dando como resultado la estructura miniUIB-Km (Fig. 1B). El plásmido resultante, pJOC22Km, se transfirió a *P. stutzeri* AN10 (cepa original con *ISPPu12* codificado en su genoma) y *P. stutzeri* AN11 (control negativo, carente de estructuras semejantes a *ISPPu12* en su genoma) mediante una conjugación de 7 horas usando la cepa *E. coli* S17-1 λ _{pir} como cepa dadora. Se esperaba que la interacción conjugativa activara el mecanismo de transposición de *ISPPu12* en *P. stutzeri* AN10, provocando un efecto en *trans* en el miniUIB-Km entrante localizado en el plásmido pJOC22Km. El plásmido pGP704Km, semejante a pJOC22Km pero carente de IRs flanqueando al casete de resistencia

15

20

a kanamicina, se usó como control negativo.

Tal como se muestra en la Tabla 2, la frecuencia de adquisición de la resistencia a kanamicina fue al menos 500 veces mayor en *P. stutzeri* AN10 cuando el gen de resistencia al antibiótico estaba flaqueado por las IRs. Más aun, todos los transconjugantes resistentes a kanamicina analizados no adquirieron la resistencia a ampicilina del vector. Por otro lado, cuando pGP704Km se usó como plásmido conjugativo, la resistencia a kanamicina se adquirió con una tasa similar a la adquisición de la resistencia a ampicilina del vector (Tabla 2).

- 10 Tabla 2. Frecuencia de adquisición de resistencia a antibiótico tras la conjugación. Se empleó *E. coli* S17.1 λ_{pir} como cepa dadora. Los valores mostrados corresponden a la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes de conjugación.

Cepa receptora	Plásmido	Adquisición de Km ^R (Km ^R Ap ^R)	Adquisición de Ap ^R (Ap ^R Km ^R)
<i>P. stutzeri</i> AN10	pGP704Km	6,9 $\pm$ 0,9 $\times$ 10 ⁻⁷ (82 %)	6,5 $\pm$ 1,2 $\times$ 10 ⁻⁷ (79 %)
	pJOC22Km	3,4 $\pm$ 0,7 $\times$ 10 ⁻⁴ (0 %)	7,4 $\pm$ 0,4 $\times$ 10 ⁻⁷ (82 %)
<i>P. stutzeri</i> AN11	pGP704Km	6,1 $\pm$ 1,5 $\times$ 10 ⁻⁸ (74 %)	6,2 $\pm$ 2,3 $\times$ 10 ⁻⁸ (80 %)
	pJOC22Km	5,8 $\pm$ 0,9 $\times$ 10 ⁻⁸ (78 %)	6,5 $\pm$ 1,1 $\times$ 10 ⁻⁸ (77%)

- 15 Dado que el plásmido es incapaz de replicarse en *Pseudomonas*, pGP704 se debe haber incorporado en el genoma por un proceso no relacionado con la transposición (por ejemplo, recombinación homóloga). A diferencia de los transconjugantes resistentes a kanamicina de pJOC22, que no adquirieron la resistencia a ampicilina, el 82% de los transconjugantes de pGP704Km analizados adquirieron ambas resistencias: ampicilina (Ap^R) y kanamicina (Km^R). Este resultado es consistente con una posible adquisición por recombina-
20 ción ya que los genes de resistencia cubren aproximadamente un quinto de la longitud del plásmido (estadísticamente, cada gen de resistencia a antibiótico podría ser inactivado con una frecuencia del 20% tras la adquisición por recombinación). No se observó ninguna diferencia entre ambos plásmidos, pJOC22Km y pGP704Km, cuando *P. stutzeri* AN11 (cepa carente de *ISPpu12*) se usó como receptor de conjugación (Tabla 2).

- 25 Diez transconjugantes de *P. stutzeri* AN10 (*P. stutzeri* AN10KM) que habían adquirido la resistencia a kanamicina de pJOC22Km fueron a continuación analizados mediante restricción del ADN genómico e hibridación *Southern*. Al usarse una sonda para el gen de resistencia a kanamicina (sonda KM) se observaron entre una y tres bandas de hibridación (Fig. 2A) mientras que no se observaron bandas de
30 hibridación cuando pGP704 se usó como sonda. Las hibridaciones realizadas con TNPA (una sonda específica para el gen *tnpA* de *ISPst9* e *ISPpu12*) y con TNPR (sonda específica para el gen *tnpR* de *ISPpu12*) revelaron una elevada tasa de movilización de ambos elementos de inserción de la familia ISL3 (Fig. 2B).

- 35 Con el objetivo de minimizar el número de copias de miniUIB adquiridas por las cepas receptoras, se redujo el tiempo de interacción en los experimentos de conjugación entre *E. coli* S17-1 λ_{pir} (pJOC22Km) y *P. stutzeri* AN10. Así, la frecuencia máxima de adquisición de la resistencia a kanamicina se obtuvo tras tan solo 30 minutos de interacción conjugativa (Fig. 2C). Por todo ello, los experimentos de conjugación se realizaron con interacciones de tan sólo 30 minutos, en sustitución de las 7 horas usadas
40 anteriormente.

- Para demostrar cómo la estructura miniUIB-Km transponía mediante la formación de intermediarios circulares, tal como se había descrito para los elementos de la familia ISL3 de *P. stutzeri* AN10 (Christie-Oleza et al 2010), se realizaron experimentos de interacción conjugativa entre *E. coli* S17-1 λ_{pir} y
45 transconjugantes de *P. stutzeri* AN10 que contenían la estructura miniUIB-Km. Tras obtener el ADN de la mezcla de conjugación se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores PCR3R y KMR (Tabla 1B). Tan sólo se obtuvo el producto de PCR de 1,4 kb indicativo de la circularización de miniUIB-Km en aquellos transconjugantes que conservaban la copia de *ISPpu12* en su genoma (marcados con un círculo blanco en la Fig. 2B).

50 Ejemplo 2: Estabilidad genómica de la estructura de miniUIB.

- Con el objetivo de determinar la estabilidad de las inserciones cromosómicas de miniUIB se evaluó la pérdida de la resistencia a kanamicina en los derivados de *P. stutzeri* AN10 que contenían miniUIB-Km (i)
55 después de varios subcultivos consecutivos sin presión selectiva con antibióticos y (ii) después de una segunda interacción conjugativa. Para ello se seleccionaron tres transconjugantes portadores de miniUIB-Km (*P. stutzeri* AN10KM 3, 4 y 5; indicados con un asterisco en Fig. 2). Se realizaron diez subcultivos

consecutivos en medio LB sin presión de antibióticos con cada uno de los tres derivados. Los recuentos de células viables en placas de LB suplementadas y no suplementadas con kanamicina no mostraron, en ninguno de los casos, pérdidas significativas de la resistencia a kanamicina.

- 5 Las estructuras miniUIB pueden formar intermediarios circulares y pueden perderse, tal como sucede cuando ocurre un segundo evento de conjugación. Para demostrar esta posibilidad, el plásmido replicativo en *Pseudomonas* pBBRMCS-1 se introdujo por conjugación en las tres cepas seleccionadas de *P. stutzeri* AN10Km. Los transconjugantes portadores de pBBRMCS-1 fueron aislados en placas de MBM suplementadas con succinato y cloranfenicol. Un total de 100 aislados resistentes a cloranfenicol
10 derivados de cada *P. stutzeri* AN10Km se seleccionaron para comprobar la posible pérdida de la resistencia a kanamicina tras la interacción conjugativa. La pérdida de la resistencia a kanamicina se observó tan sólo en aquellos transconjugantes que conservaban la copia de *IS_{Ppu12}*, pudiéndose correlacionar la pérdida del fenotipo con el número de copias del gen de resistencia a kanamicina en el genoma (*P. stutzeri* AN10Km-3, con 2 copias del gen Km^R , 15% pérdida; *P. stutzeri* AN10Km-4, con 1 copia del gen Km^R , 38% pérdida). No se observó pérdida de la resistencia a kanamicina en la cepa *P. stutzeri* AN10Km-5, que carecía de *IS_{Ppu12}*.
15

Ejemplo 3: Tamaño vs Frecuencia de adquisición de miniUIB.

- 20 Un dato imprescindible para usar este mecanismo como un sistema de inserción de material genético en *P. stutzeri* AN10 y en otras bacterias es conocer la cantidad máxima de ADN que la estructura miniUIB puede movilizar. Con este propósito, diferentes fragmentos de ADN fueron insertados entre las IRs del miniUIB para generar diversos derivados del mismo con fragmentos de ADN de tamaño creciente. (Fig. 1B-1H). La frecuencia de adquisición de las diferentes estructuras derivadas de miniUIB se calculó
25 siguiendo la aparición del marcador de resistencia a antibiótico apropiado en *P. stutzeri* AN10 tras su inserción por conjugación y transposición. La frecuencia máxima de adquisición de miniUIB se alcanzó con el derivado más pequeño (miniUIB-Km, 1,6 kb, $3,4 \pm 0,7 \times 10^{-7}$) y disminuyó a medida que el tamaño se incrementaba, manteniendo una correlación logarítmica hasta las 12 kb ($R^2=0,9873$) (Fig. 3). Hasta las 12 kb, la frecuencia de transposición mediante miniUIB fue mayor que la frecuencia control, obtenida con
30 el plásmido pGP704km. La frecuencia de transposición de las estructuras con tamaños cercanos a 12 kb, en concreto de 11,8 kb, es un orden de magnitud mayor que la frecuencia de adquisición por recombinación obtenida con el plásmido pGP704km (Tabla 2 y Fig. 3). Esto se corroboró con el elevado incremento de la detección de colonias resistentes a ampicilina (marcador genético del vector pGP704) al usarse derivados de miniUIB con fragmentos de ADN grandes. En este sentido, más del 50% de los
35 transconjugantes para el miniUIB de 11,8 kb fueron resistentes a ampicilina, es decir, aún con estos tamaños sigue siendo mayor la transposición gracias a miniUIB que la que ocurriría por ejemplo por recombinación (Fig. 3).

- 40 La frecuencia con que las células receptoras reciben Km^R se calculó dividiendo el número de transconjugantes obtenidos por el número de células receptoras contadas inmediatamente tras la conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas MBM suplementadas con succinato y Km. Las cepas receptoras se contaron en placas MBM suplementadas con succinato. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de transconjugantes Km^R que además adquieren el determinante Ap^R (Tabla 2).

- 45 La frecuencia con que las células receptoras reciben Ap^R se calculó dividiendo el número de transconjugantes Ap^R obtenidos por el número de células receptoras contadas inmediatamente tras la conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas MBM suplementadas con succinato y Ap. Las cepas receptoras se contaron en placas MBM suplementadas con succinato. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de transconjugantes Ap^R que además adquieren el determinante Km^R (Tabla 2).
50

Ejemplo 4: Aplicaciones biotecnológicas de miniUIB en *P. stutzeri* AN10.

- A continuación se presentan dos ejemplos en los que miniUIB se utilizó para incrementar el interés biotecnológico de *P. stutzeri* AN10. En el primer experimento se ha intentado convertir a la cepa AN10 en
55 un microorganismo psicrófilo, similar a lo hecho previamente por Ferrer y colaboradores con *E. coli* (Ferrer et al. 2003 Nat. Biotechnol. 21:1266-1267). En el segundo experimento, hemos transformado a *P. stutzeri* AN10 en una cepa degradadora de alcanos.

- 60 Para permitir la psicrofilia de *P. stutzeri* AN10, el gen que codifica la chaperonina (*cpn*) de *Oleispira antarctica* se clonó bajo el control del promotor de la chaperonina de *P. stutzeri* AN10 (P_{hsp}). La estructura resultante (P_{hsp} -*cpn*) se emplazó entre las IRs de miniUIBb, un derivado de miniUIB deficiente en el sitio de restricción NdeI, dando como resultado la estructura miniUIB-CHAP (Fig. 1J). El determinante de resistencia a kanamicina del plásmido pCSI2 se insertó entre las IRs dando lugar a la estructura

transponible definitiva: miniUIB-Km/CHAP (Fig. 1K). Tras conjugación convencional, el plásmido pJOC29, portador de miniUIB-Km/CHAP, se introdujo en *P. stutzeri* AN10. Transconjugantes resistentes a kanamicina fueron seleccionados en MBM suplementado con succinato y dicho antibiótico. Seis de estos transconjugantes fueron seleccionados para analizar su capacidad de crecimiento a 4 °C. Todos ellos alcanzaron la fase estacionaria en 7 días. Cuatro de ellos crecieron hasta densidades ópticas similares a las de la cepa salvaje (Absorbancia a 600 nm: $A_{600} > 0,7$). Los otros dos alcanzaron valores de A_{600} superiores a 1,0. Ambos clones resultaron ser portadores de la estructura miniUIB-Km/CHAP. Uno de ellos (*P. stutzeri* AN10-Km/CHAP) se utilizó para llevar a cabo curvas de crecimiento detalladas. Como se muestra en la Fig. 4, el tamaño de la población de AN10-Km/CHAP al llegar a la fase estacionaria fue superior (A_{600} de $1,05 \pm 0,04$) al observado para la cepa AN10 (A_{600} de $0,64 \pm 0,02$ unidades). A pesar de ello, los tiempos de duplicación no fueron estadísticamente significativos en comparación a los observados para la cepa silvestre (transconjugante AN10-Km/CHAP, $15,3 \pm 0,3$ h; AN10, $15,9 \pm 0,6$ h). En cualquier caso, se intentó introducir la estructura miniUIB-CHAP (sin el determinante de resistencia a kanamicina) en *P. stutzeri* AN10. Desafortunadamente, la ventaja de poseer la nueva chaperonina para la psicofilia de la cepa AN10 no fue lo suficientemente fuerte para la selección de transconjugantes miniUIB-CHAP sin el uso de la resistencia a antibiótico. En este sentido, no fuimos capaces de aislar transconjugantes miniUIB-CHAP que mejorasen en crecimiento a los no transconjugantes tras conjugación, ni en cultivo líquido ni por siembra directa en placa a 4° C.

En segundo lugar, para permitir el uso de alcanos en *P. stutzeri* AN10 como fuente única de carbono y energía, se construyó el plásmido pALK (Tabla 1A) que contenía el minitransposón miniUIB-ALK (Fig. 1M). La estructura miniUIB-ALK contenía los operones de degradación de alcano de *P. putida* TF4-1L (GPo1) (Schwartz 1973): el operón regulador de 4,3 kb *alkST* y el operón catabólico de 8,3 kb *alkBFGHJKL*. El plásmido pALK se introdujo en AN10 por conjugación. La mezcla de células se recogió e incubó en MBM suplementado con n-octano al 2% como fuente única de carbono y energía para seleccionar aquellos transconjugantes portadores de miniUIB-ALK. Se ha descrito que los genes *alkBFGHJKL* solo realizan los primeros pasos de la degradación de alcano, capturando, hidroxilando y dehidrogenando el compuesto (van Beilen et al 1994 Biodegradation 5:161-174). El ciclo de betaoxidación de las células es necesario para completar la mineralización. La vía de degradación de los ácidos grasos en *P. stutzeri* podría estar expresada constitutivamente como sucede en *P. putida* (van Beilen et al 1994) o podría estar inducida por ácidos grasos de cadenas más largas de C_{12} , como sucede en *E. coli* (Eggink et al. 1987 J. Biol. Chem. 262:17712-17718). Para asegurar la inducción de los genes de degradación de los ácidos grasos, y no depender de la aparición de un mutante constitutivo se añadió también un 2% de n-hexadecano en el medio de cultivo. Solo se obtuvo crecimiento en aquellos cultivos de AN10 que habían sido conjugados con el plásmido pALK, y no en ninguno de los controles negativos utilizados.

Diluciones seriadas del cultivo en alcano fueron incubadas en placas de MBM suplementadas con vapores de n-octano y n-hexadecano como fuentes únicas de carbono y energía. Ocho transconjugantes (*P. stutzeri* AN10-ALK) fueron aislados y comprobados. Todos ellos resultaron ser derivados de la cepa AN10 y eran capaces de crecer independientemente del resto usando una mezcla de n-octano/n-hexadecano como fuente única de carbono y energía. El análisis de hibridación demostró que siete de los ocho transconjugantes habían recibido por transposición la estructura miniUIB-ALK. De estos siete, tan sólo uno de ellos reveló más de una copia de la estructura miniUIB-ALK en su genoma (Fig. 5A). Dos de ellos, AN10-ALK-3 y AN10-ALK-8, fueron seleccionados para realizar experimentos de crecimiento detallados. Ambas cepas fueron capaces de crecer con n-octano como única fuente de carbono y energía, y vieron duplicado su tamaño de población cuando n-hexadecano fue añadido al medio previamente suplementado con n-octano (Fig. 5B). No se detectó crecimiento cuando el n-hexadecano se utilizó como fuente única de carbono y energía debido a que los genes *alk* utilizados sólo permiten el catabolismo de los alcanos de cadenas con longitudes que oscilan entre los 5 y los 12 carbonos (van Beilen et al 1994). No se detectaron diferencias debidas a la presencia de uno o dos copias de los genes *alk* (Fig. 5B), muy probablemente debido al sistema de enriquecimiento utilizado en el aislamiento.

Ejemplo 5: Uso del miniUIB en otras bacterias.

El uso de miniUIB en otras bacterias se probó mediante la clonación de los genes reguladores y la transposasa de *IS_{Ppu12}* en el vector suicida. Así, la secuencia completa *IS_{Ppu12}* sin sus IRs fue insertada en el sitio de restricción EcoRI de pJOC21, obteniéndose el plásmido pJOC100 (Fig. 1N). La estructura genética de *IS_{Ppu12}* se conservó para asegurar el mantenimiento del fenotipo de activación tras interacción conjugativa. A diferencia de lo visto con los mini-Tn5 (de Lorenzo et al 1990), el plásmido pJOC100 fue perfectamente estable cuando se le introdujeron insertos de ADN entre las IRs.

Para probar el rango de hospedadores de miniUIB, se construyó la estructura miniUIB-Km en el nuevo vector, dando como resultado el plásmido pJOC100Km (Fig. 1O). En primer lugar, esta construcción se

probó en tres cepas distintas que carecían de *IS_{Ppu12}* en su genoma y que son normalmente utilizadas en nuestro laboratorio (*K. pneumoniae* CMD1, *P. stutzeri* AN11 y *P. putida* IS⁻). Las frecuencias de transposición se compararon con las que obtuvimos utilizando el minitransposón homólogo miniTn5-Km1 (Herrero et al 1990, de Lorenzo et al 1990). Todos los experimentos de conjugación se realizaron por triplicado.

Resulta interesante que, en todos los casos, las frecuencias de adquisición de la resistencia a kanamicina obtenidas fueron más altas al usar miniUIB-Km (*K. pneumoniae* CMD1, $4,91 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ para miniUIB-Km, $1,4 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ para miniTn5-Km1; *P. stutzeri* AN11, $1,1 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ para miniUIB-Km, $3,9 \pm 1,2 \times 10^{-8}$ para miniTn5-Km1; *P. putida* IS⁻, $9,7 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ para miniUIB-Km, $5,2 \pm 2,8 \times 10^{-6}$ para miniTn5-Km1).

Para clarificar si miniUIB-Km se había insertado al azar en monocopia, ocho derivados resistentes a kanamicina de *P. stutzeri* AN11 fueron seleccionados y se realizó una hibridación *Southern* de sus ADNs genómicos digeridos con EcoRI contra la sonda KM. Todos los derivados resistentes a kanamicina revelaron una única banda de hibridación y mostraron patrones de hibridación distintos (Fig. 6). Estos resultados sugieren que miniUIB-Km se insertó al azar por transposición en el genoma de *P. stutzeri* AN11 y, de este modo, demuestra su utilidad como herramienta eficiente para mutagénesis por transposición.

Con el objetivo de extender el rango de hospedadores de miniUIB-Km, realizamos un estudio comparativo con 50 aislados procedentes de playas contaminadas por petróleo tras el accidente del Prestige (Galicia, España) que eran filogenéticamente diferentes. Estos 50 aislados se seleccionaron de nuestra colección de 292 cepas porque eran sensibles a kanamicina y desarrollaban colonias fácilmente identificables tras 48 horas de incubación a 30°C en MBM suplementado con succinato (0,5 % peso/volumen). El análisis de secuencias parciales del ADN_r 16S mostró su afiliación a 6 grupos filogenéticos diferentes dentro de *Bacteria*: Alfaproteobacteria (6 aislados de 5 géneros diferentes), Betaproteobacteria (7 aislados de 4 géneros diferentes), Gammaproteobacteria (20 aislados de 10 géneros diferentes), Bacteroidetes (3 aislados de *Cytophaga* sp.), Actinobacteria (11 aislados de 5 géneros diferentes) y Firmicutes (3 aislados de 2 géneros diferentes). La Figura 7 resume la afiliación filogenética de las cepas ensayadas y los resultados obtenidos en experimentos de conjugación con ambos minitransposones (miniUIB-Km *versus* miniTn5-Km1).

Los experimentos de transposición con ambos minitransposones no rindieron adquisición de la resistencia a kanamicina en un total de 15 de las 50 cepas utilizadas. En este sentido, ninguno de los minitransposones pudo transponer en aislados de Bacteroidetes. MiniUIB-Km transpuso en 35 de las 50 cepas ensayadas mientras que miniTn5-Km1 fue capaz de transponer en tan sólo 30 de ellas.

Resulta interesante que sólo miniUIB-Km y no miniTn5-Km1 fue capaz de transponer en Firmicutes (1 aislado afiliado a *Bacillus* sp.).

El 73% de las cepas ensayadas mostraron mejores frecuencias de adquisición de la resistencia a kanamicina con miniUIB-Km, siendo la diferencia en 7 de ellas superior a un orden de magnitud. Por otro lado, sólo 2 de las 50 cepas ensayadas resultaron en frecuencias de transposición mayores de un orden de magnitud a favor de miniTn5-Km.

Así, podemos concluir que miniUIB-Km puede ser usado como herramienta de mutagénesis por transposición en un amplio rango de *Bacteria*, incluyendo bacterias Gram positivas, siendo su rango de hospedadores probablemente superior al de miniTn5-Km1. Además, este resultado sugiere un uso eficiente de la estructura miniUIB para introducir material genético foráneo en un amplio rango de *Bacteria*, y no tan sólo en *P. stutzeri* AN10.

Para probar que la estructura miniUIB podía ser usada para introducir material genético biotecnológicamente relevante en bacterias defectivas de *IS_{Ppu12}* distintas a *P. stutzeri* AN10, se decidió transformar *P. stutzeri* AN11 en una cepa degradadora de alcanos mediante la introducción por transposición de la estructura miniUIB-ALK. Por ello se construyó pJOC100ALK (Fig. 1P) mediante clonación de *IS_{Ppu12}* sin IRs en el sitio de restricción EcoRI del plásmido pALK. Siguiendo la estrategia descrita para *P. stutzeri* AN10, se obtuvo una población derivada de *P. stutzeri* AN11 capaz de crecer utilizando una mezcla de n-octano y n-hexadecano como fuentes únicas de carbono y energía. Tal como se esperaba, no se observó crecimiento en los cultivos control. Tampoco ocurrió transposición de miniUIB-ALK situado en pALK ya que no había *IS_{Ppu12}* ni en el plásmido ni en el genoma de la cepa AN11. Solo se observó crecimiento en las conjugaciones realizadas con *E. coli* S17.1_{pir} (pJOC100ALK).

Un total de 10 transconjugantes de *P. stutzeri* AN11 con el fenotipo degradador de alcanos (*P. stutzeri*

AN11-ALK) fueron aislados y analizados por hibridación *Southern* contra la sonda ALK. Este experimento reveló la adquisición al azar de la estructura miniUIB100ALK (Fig. 8A). En la mayoría de los transconjugantes se observaron dos bandas de hibridación, muy probablemente debido al sistema de enriquecimiento utilizado que premiaba a los microorganismos más eficaces en crecer a expensas de la mezcla de alcanos. No se observó ninguna banda de hibridación cuando se utilizó la sonda PGP, sugiriendo que todos los aislados *P. stutzeri* AN11-ALK adquirieron la estructura miniUIB-ALK por transposición verdadera. Tal como se hizo con los derivados de AN10, dos cepas de *P. stutzeri* AN11-ALK se seleccionaron para realizar experimentos de crecimiento más detallados (Fig. 5B). De nuevo, ambos transconjugantes AN11-ALK pudieron crecer con n-octano aunque su crecimiento se duplicó cuando el medio de cultivo se suplementó con n-hexadecano. De manera similar, ambos transconjugantes fueron incapaces de utilizar n-hexadecano como fuente única de carbono y energía. No se observó ninguna diferencia en las tasas de crecimiento asociadas a la presencia de una o dos copias de miniUIB-ALK.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que comprende las repeticiones invertidas izquierda y derecha de la secuencia de inserción IS*Pst*9 de *Pseudomonas stutzeri*.
5
2. La construcción génica según la reivindicación 1, donde la repetición invertida izquierda comprende SEQ ID NO: 1 y la repetición invertida derecha comprende SEQ ID NO: 2.
3. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la repetición invertida izquierda consiste en SEQ ID NO: 1 y la repetición invertida derecha consiste en SEQ ID NO: 2.
10
4. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha construcción comprende al menos una secuencia diana de una enzima de restricción entre las dos repeticiones invertidas izquierda y derecha.
15
5. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha construcción comprende un sitio de multiclonación entre las dos repeticiones invertidas izquierda y derecha.
6. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha construcción comprende SEQ ID NO: 3.
20
7. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicha construcción consiste en SEQ ID NO: 3.
8. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicha construcción está flanqueada por dos dianas de enzimas de restricción.
25
9. La construcción génica según la reivindicación 8, donde las dos dianas de enzimas de restricción son iguales.
30
10. La construcción génica según la reivindicación 8, donde las dos dianas de enzimas de restricción son distintas.
11. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha construcción es un vector.
35
12. La construcción génica según la reivindicación 11, donde dicho vector comprende un origen de replicación, al menos un gen de movilización, un sitio múltiple de clonación y/o al menos un gen de resistencia a antibiótico.
40
13. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, donde dicha construcción comprende SEQ ID NO: 4.
14. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde entre las repeticiones invertidas izquierda y derecha dicha construcción comprende una secuencia nucleotídica de interés de entre 1 y 12.000 pares de bases.
45
15. La construcción génica según la reivindicación 14, donde la secuencia nucleotídica de interés tiene entre 500 y 2.000 pares de bases.
50
16. Uso de la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la transferencia de una secuencia nucleotídica de interés.
17. Uso según la reivindicación 16, donde la transferencia de la secuencia nucleotídica de interés se hace en una célula del dominio *Bacteria* cuyo filo se selecciona entre: Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes.
55
18. Uso según la reivindicación 17, donde la Proteobacteria es de la clase Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria o Gammaproteobacteria.
60
19. Uso según la reivindicación 18, donde la Proteobacteria es de la clase Gammaproteobacteria.
20. Uso según la reivindicación 19, donde la Gammaproteobacteria es del género *Pseudomonas*.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde se transfiere una única copia de la secuencia de interés.
- 5 22. Uso según la reivindicación 21, donde la Gammaproteobacteria es *Escherichia coli*.
23. Uso de la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la mutagénesis aleatoria.
- 10 24. Método para la transposición de una secuencia nucleotídica de interés que comprende las siguientes etapas:
 - a) introducir la secuencia nucleotídica de interés a transponer entre las repeticiones invertidas de la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15;
 - 15 b) introducir la construcción génica resultante de la etapa (a) en una bacteria dadora; y,
 - c) inducir la conjugación de la bacteria dadora con una bacteria receptora.
25. Método según la reivindicación 24, donde la bacteria dadora es de la especie *Escherichia coli* y comprende la maquinaria de replicación del fago lambda.
- 20 26. Método según la reivindicación 25, donde la bacteria dadora es *Escherichia coli* S17.1 λ_{pir} .
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, donde la bacteria receptora es *Pseudomonas stutzeri*.

FIG. 1



FIG. 2

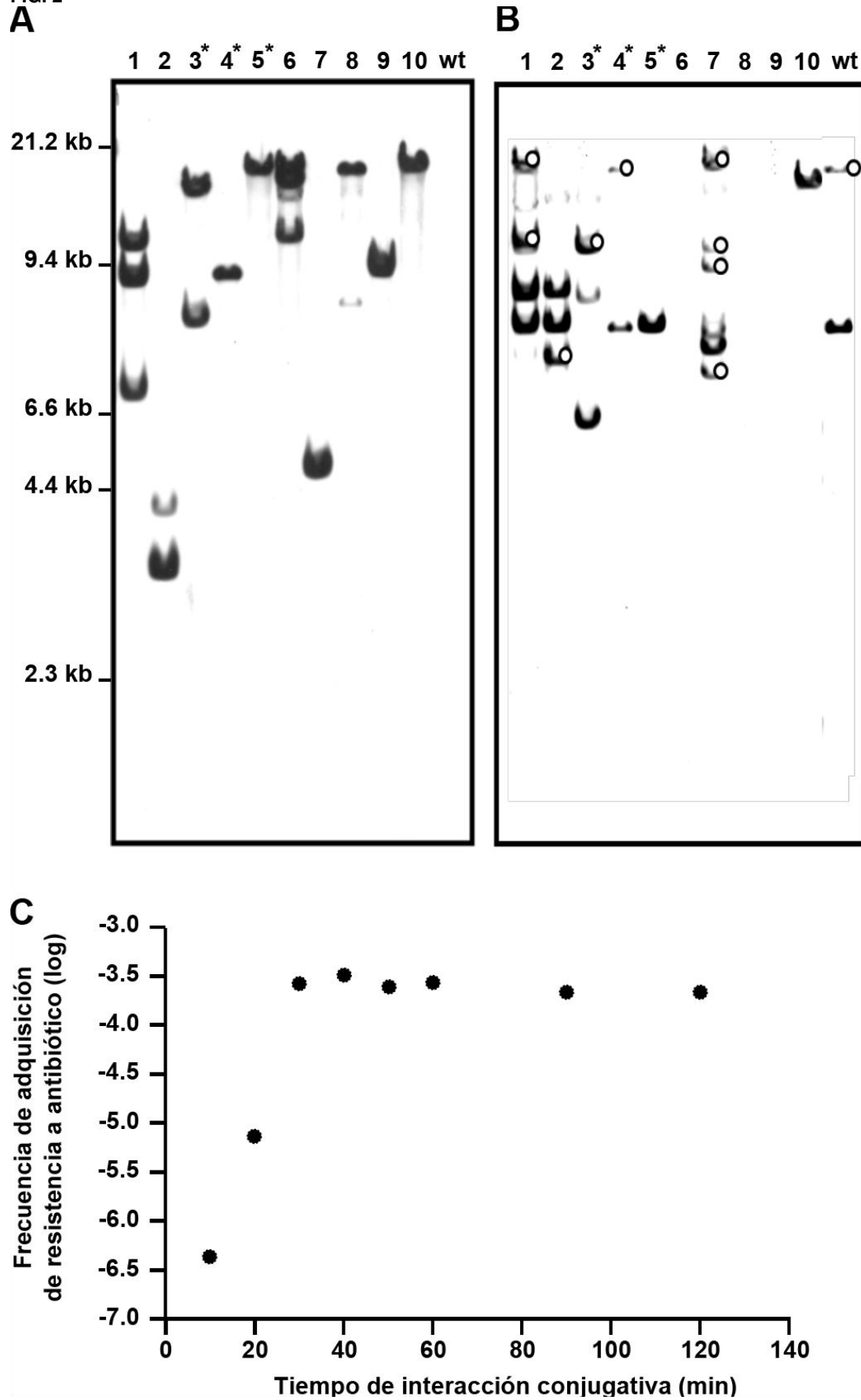


FIG. 3

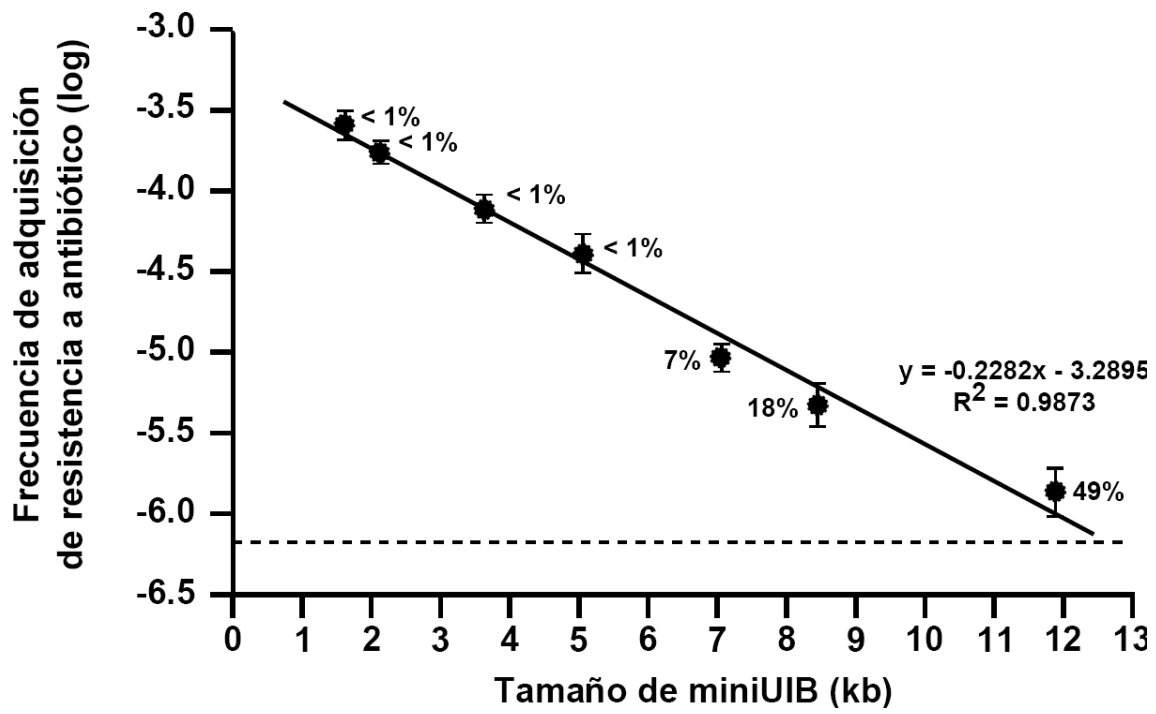


FIG. 4

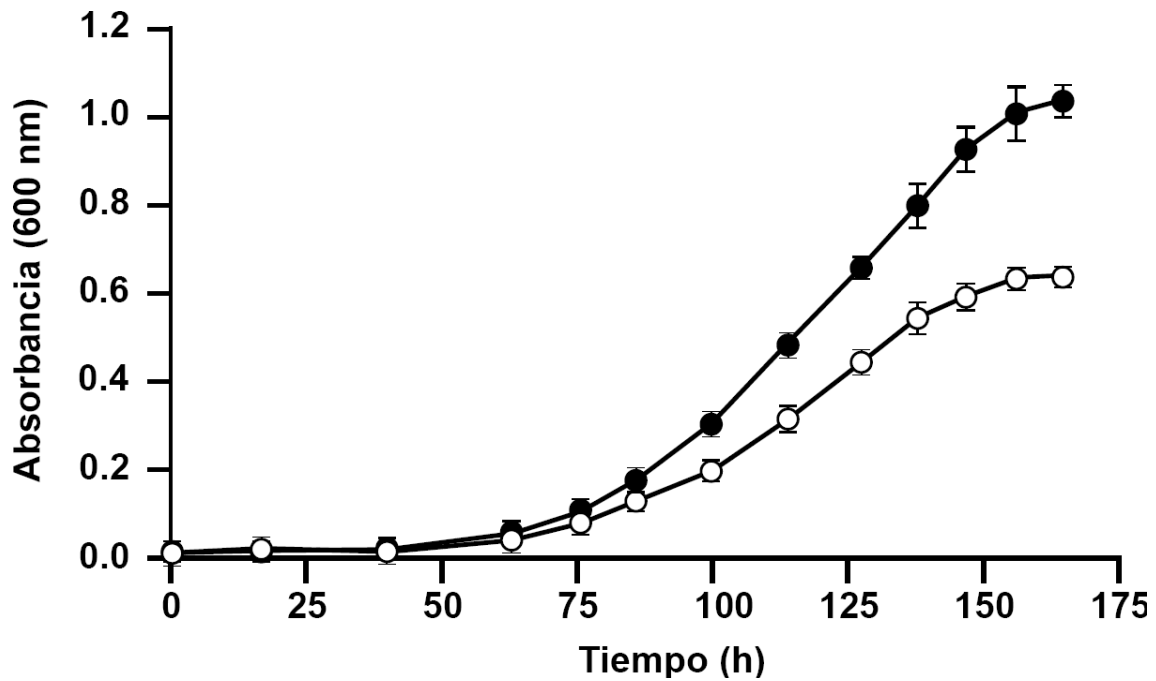


FIG. 5

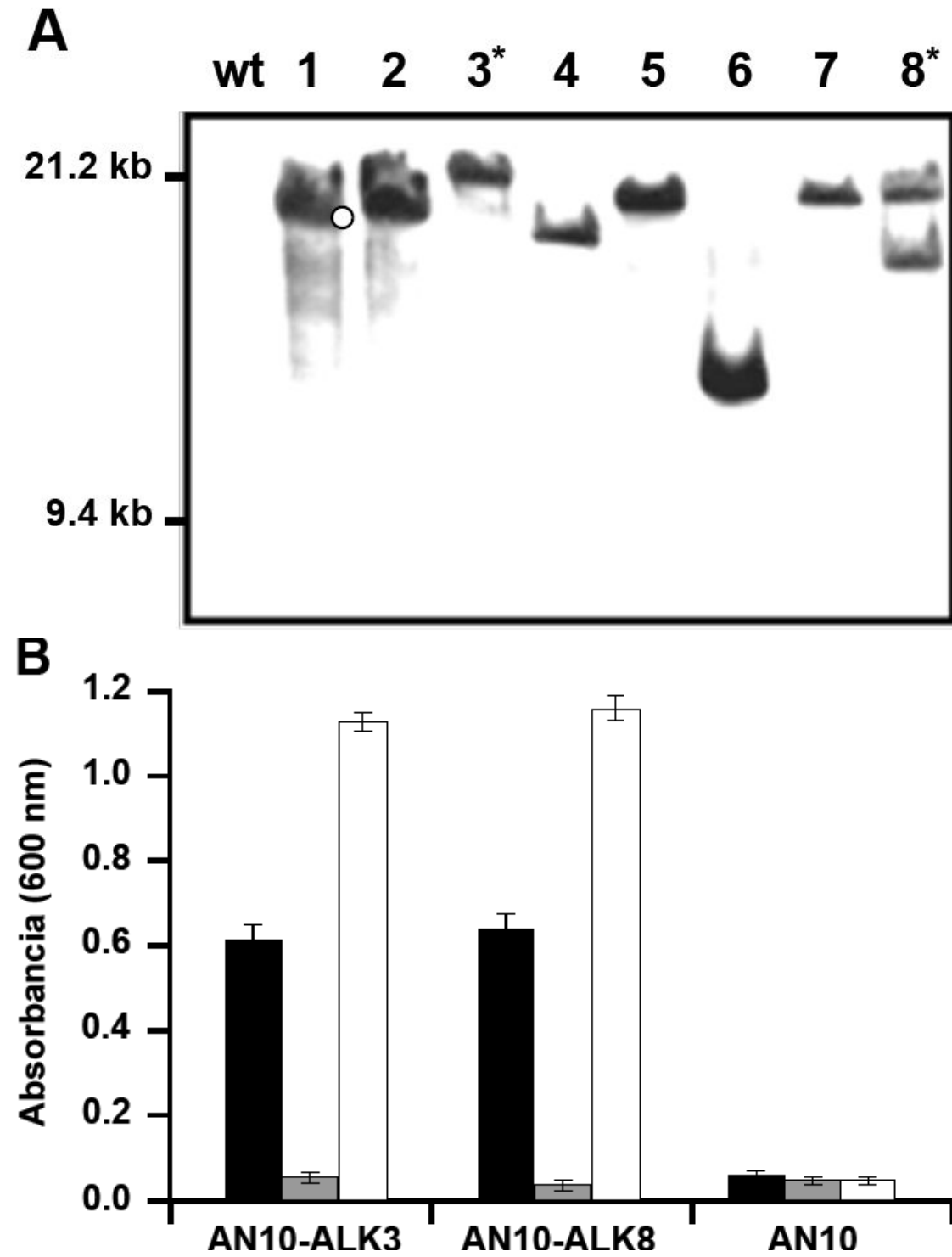


FIG. 6

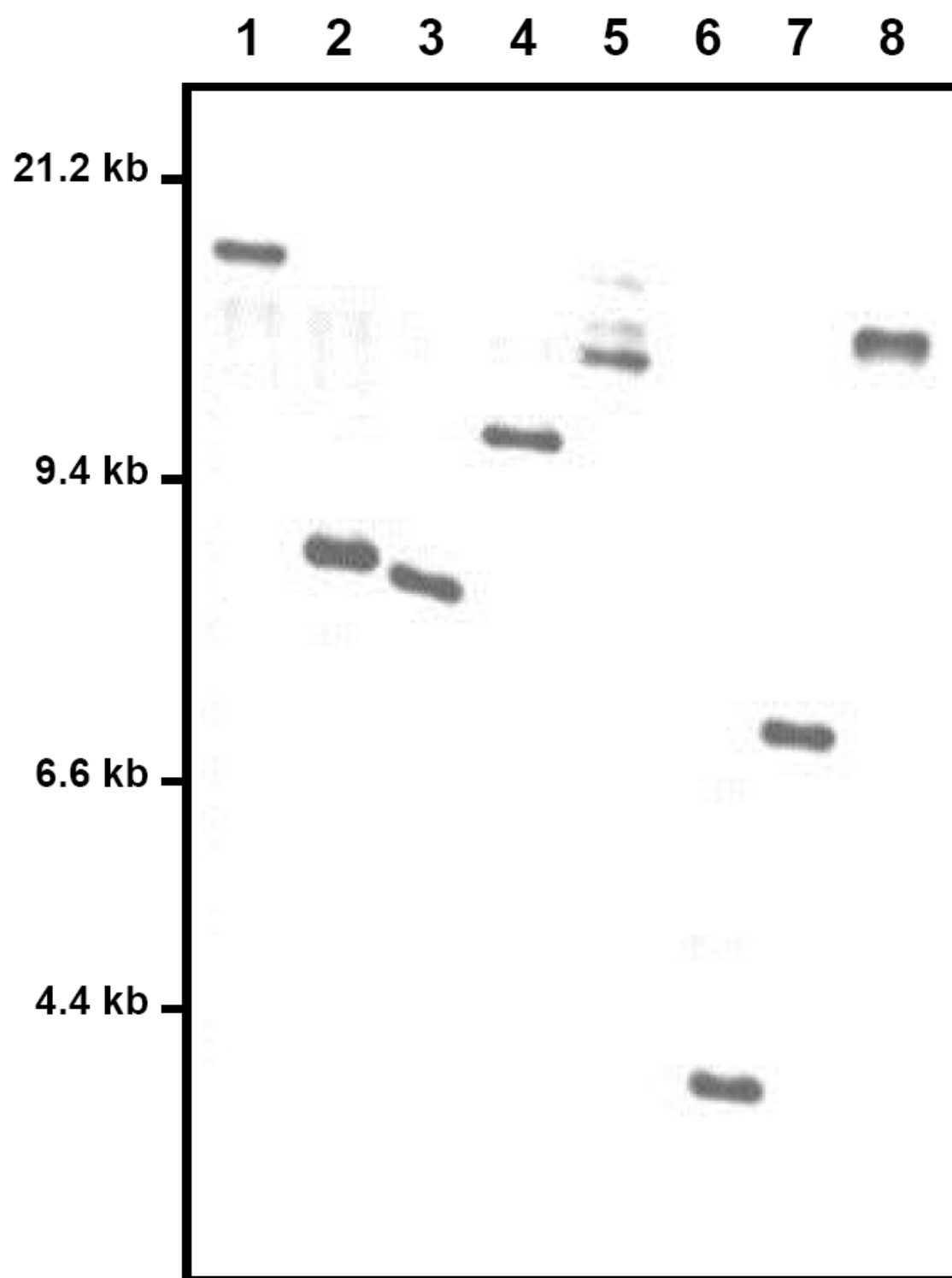


FIG. 7

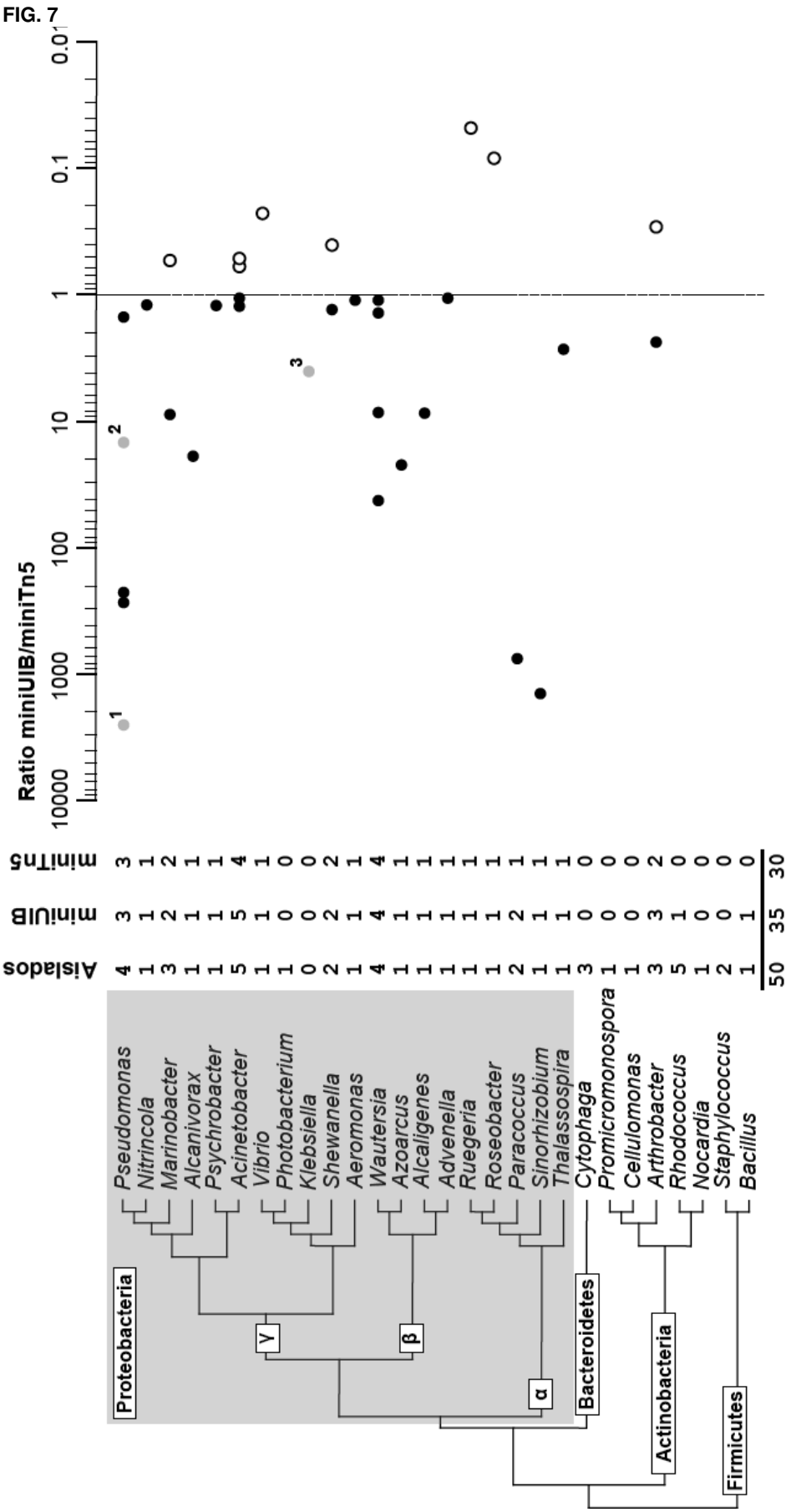
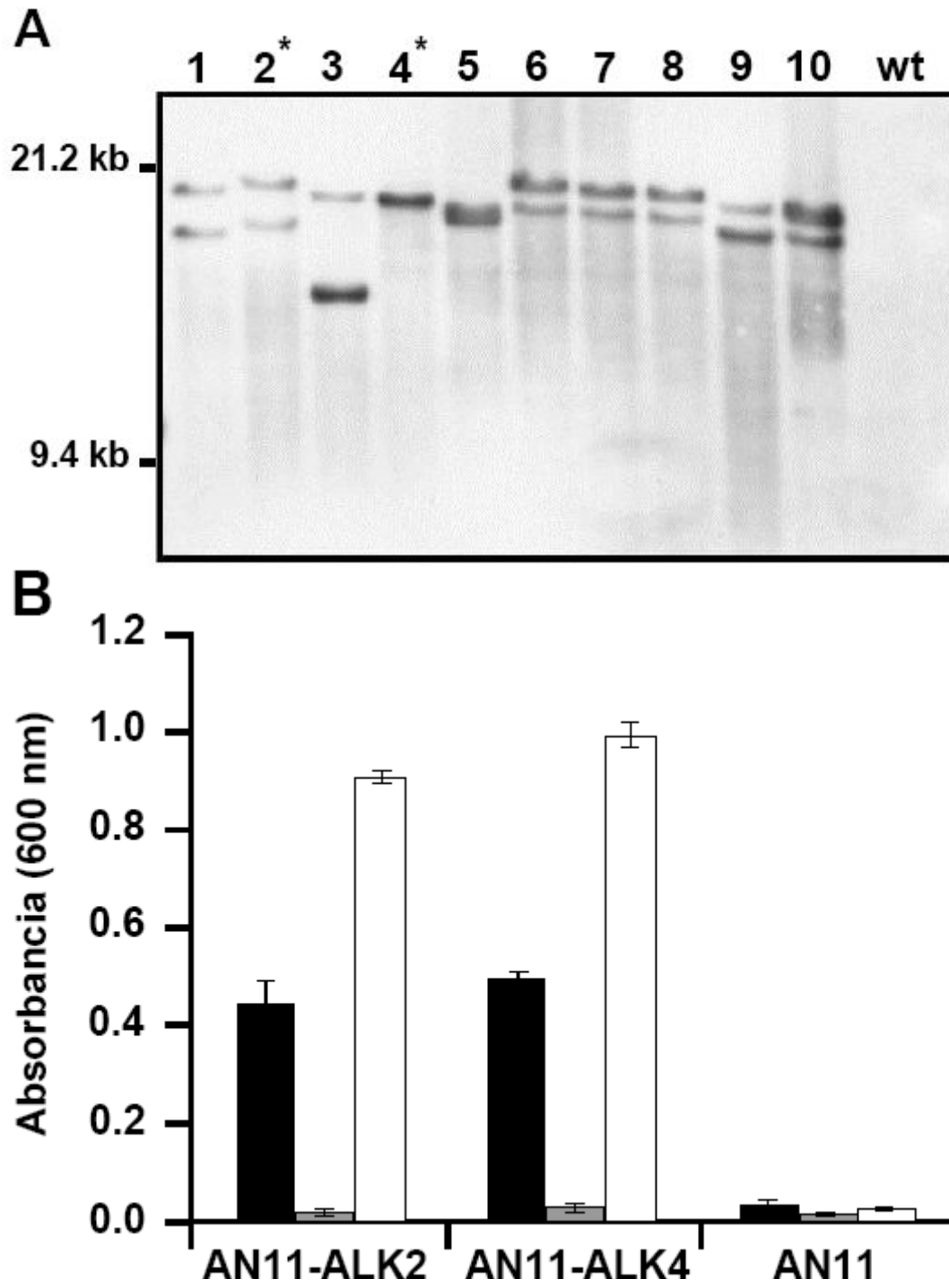


FIG. 8



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitat de les Illes Balears
 <120> Minitransposón miniUIB y usos derivados
 <130> ES1597.14
 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas stutzeri
 <400> 1
 gggatatgcgg atttaatggg tgat 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas stutzeri
 <400> 2
 atcaaccatt aaatccgcat accc 24
 <210> 3
 <211> 293
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> MiniUIB
 <400> 3
 gggatatgcgg atttaatggg tgatatgtga agtagaaagc ggaagggaaa actaaatcca 60
 caacggacta aatgggttgat agctaaccgt gccgggtcttt ccagatcccc ttccctatag 120
 ccatatgtag ggaacacttg aaaactaggc atatctgtct tgacaatagc ccgggtctag 180
 aggtaccgca tgcgatatcg agctcaacta cgggggtcgat ctatcaacca tctgagggta 240
 gcatcagggtt ggtgagggga aggtgccccca tcaaccatta aatccgcata ccc 293
 <210> 4
 <211> 3939
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> pJOC21
 <400> 4
 gatcgctagt ttgttttgac tccatccatt agggcttcta aaacgccttc taaggccatg 60
 tcagccgtta agtgttcctg tgtcactgaa aattgctttg agaggctcta agggcttctc 120
 agtgcgttac atccctggct tgttggtccac aaccgttaaa ccttaaaagc tttaaaagcc 180
 ttatatattc ttttttttct tataaaactt aaaaccttag aggctattta agttgctgat 240
 ttatattaat tttattgttc aaacatgaga gcttagtacg tgaaacatga gagcttagta 300

ES 2 433 697 B1

cgtagccat gagagcttag tacgttagcc atgaggggtt agttcgtaa acatgagagc 360
 ttagtacgtt aaacatgaga gcttagtacg tgaacatga gagcttagta cgtactatca 420
 acagggtgaa ctgctggatc ctttttgtcc ggtgttgggt tgaagggtgaa gccggtcggg 480
 gccgcagcgg gggccggctt ttcagccttg cccccctgct tcggccgccg tggctccggc 540
 gtcttgggtg ccggcgcggg ttccgcagcc ttggcctgcg gtgcgggcac atcggcgggc 600
 ttggccttga tgtgccgcct ggcgtagcag cggaacgtct cgtaggagaa cttgaccttc 660
 cccgtttccc gcatgtgctc ccaaattggtg acgagcgcac agccggacgc taacgccgcc 720
 tcgacatccg ccctcaccgc caggaacgca accgcagcct catcacgccg gcgcttcttg 780
 gccgcgcggg attcaaccca ctgcggccagc tcgtcggtgt agctcttttg catcgtctct 840
 cgcctgtccc ctgagttcag taatttcctg catttgccctg tttccagtcg gtagatatcc 900
 caaaaacag caggaagca gcgcttttcc gctgcataac cctgcttcgg ggtcattata 960
 gcgatttttt cggtatatcc atcctttttc gcacgatata caggattttg ccaaagggtt 1020
 cgtgtagact ttccttggtg tatccaacgg cgtcagccgg gcaggatagg tgaagtaggc 1080
 ccaccgcga gcgggtgttc cttcttact gtcccttatt cgcacctggc ggtgctcaac 1140
 gggaaatcctg ctctgcgagg ctggccggct accgccggcg taacagatga gggcaagcgg 1200
 atggctgatg aaaccaagcc aaccaggaag ggcagccac ctatcaaggt gtactgcctt 1260
 ccagacgaac gaagagcga tgaggaaaag gcggcgccgg ccggcatgag cctgtcggcc 1320
 tacctgctgg ccgtcggcca gggctacaaa atcacggcg tcgtggacta tgagcacgtc 1380
 cgcgagctgg cccgcatcaa tggcgacctg ggccgcctgg gcggcctgct gaaactctgg 1440
 ctaccgacg accgcgcac ggcgcggttc ggtgatgcca cgatcctcgc cctgctggcg 1500
 aagatcgaag agaagcagga cgagcttggc aaggtcatga tgggcgtggt ccgcccagg 1560
 gcagagccat gactttttta gccgtaaaa cggccggggg gtgcgcgtga ttgccaagca 1620
 cgtcccatg cgctccatca agaagagcga cttcgcgag ctggtgaagt acatcaccga 1680
 cgagcaaggc aagaccgagc gcctgggtca cgtgcgcgtc acgaactgcg aggcaaacac 1740
 cctgcccgtg gtcatggccg aggtgatggc gaccagcac ggcaacacc gttccgaggc 1800
 cgacaagacc tatcacctgc tggtagctt ccgcgcggga gagaagccc acgcggagac 1860
 gttgcgcgcg attgaggacc gcatctgcgc tgggcttggc ttcgccgagc atcagcgcgt 1920
 cagtgccgtg catcacgaca ccgacaacct gcacatccat atcgccatca acaagattca 1980
 cccgacccga aacaccatcc atgagccgta tcgggcctac cgcgccctcg ctgacctctg 2040
 cgcgacgtc gaacgggact acgggcttga gcgtgacaat cacgaaacgc ggcagcgcgt 2100
 ttccgagaac cgcgcgaacg acatggagcg gcacgcgggc gtggaaagcc tggtcggctg 2160
 gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcacgggc gccacagggtg cggttgctgg 2220
 cgcctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 2280
 cgcttgtttc ggcgtgggta tggtagcagg ccccgtaggc gggggactgt tgggcgcat 2340
 ctcttgctg cctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 2400

ES 2 433 697 B1

cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 2460
 cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg 2520
 gagtgtatac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcacaaaaa 2580
 ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 2640
 ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 2700
 tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 2760
 tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca 2820
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 2880
 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 2940
 tgttgccatt gctgcaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 3000
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg 3060
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 3120
 gggtatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 3180
 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 3240
 ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 3300
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 3360
 ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 3420
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 3480
 gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 3540
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 3600
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctgc agatcttcgg gtatgcggat ttaatggttg 3660
 atatgtgaag tagaaagcgg aagggaacaa taaatccaca acggactaaa tggttgatag 3720
 ctaaccgtgc cggctcttcc agatccccct ccctatagcc atatgtaggg aacacttgaa 3780
 aactaggcat atctgtcttg acaatagccc gggcttagag gtaccgcatg cgatatcgag 3840
 ctcaactacg gggctgatct atcaaccatc tgagggtagc atcagggttg tgaggggaag 3900
 gtgccccatc aaccattaaa tccgcatacc cacgaatcc 3939

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM-F

<400> 5
 aaacgtcttg ctcgaggcc 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	KM-R	
<400>	6	
	ggagaaaact caccgaggc	19
<210>	7	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	ALK-F	
<400>	7	
	aatctagatt tccagcagac gacggagc	28
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	ALK-R	
<400>	8	
	cgcgccgagc tccagcggtg tcc	23
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR3-F	
<400>	9	
	gagatcttcg ggtatgcgga tttaatg	27
<210>	10	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR3-R	
<400>	10	
	gatctagacc cgggctattg tcaagacag	29
<210>	11	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR3-Rb	
<400>	11	
	agtctagacc cgggctatag ggaaggggat c	31

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR1-F

 <400> 12
 caggtaccgc atgaccgaaa tgcccga 27

 <210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR1-R

 <400> 13
 ggaattcgtg ggtatgcgga tttaatgg 28

 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> HSP-F

 <400> 14
 gtctagattg aacgcccgcgca tgtag 25

 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> HSP-R

 <400> 15
 gggtagcata tgcgatctct cctagtag 28

 <210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CPN-F

 <400> 16
 ccatatgaaa atccgtccat tacatg 26

 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> CPN-R

 <400> 17

cgagctcacg gtaagcagat cag 23

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ALK2-F

<400> 18
ggcgagtacc aggacggcgt aggg 24

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ALK2-R

<400> 19
ttgagctctt agaaaacata tgacgcacc 29

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ALKRsma-F

<400> 20
aaccgggggc acgtacggag tgcggg 26

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ALKRsma-R

<400> 21
aaccgggggg cgaaggccga agtcggc 27

<210> 22
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ISPPU25Eco-F

<400> 22
ttgaattctt acctttgcat gagagtgg 29

<210> 23
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ISPPU3348Eco-R

<400> 23

ttgaattcgg ggcaccttca ccccatc

27



- ②① N.º solicitud: 201230697
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.05.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHRISTIE-OLEZA J A et al. TnpR encoded by an <i>ISPpu12</i> isoform regulates transposition of two different ISL3-like insertion sequences in <i>Pseudomonas stutzeri</i> after conjugative interaction. Journal of bacteriology United States Mar 2010 03.2010 VOL: 192 No: 5 Págs: 1423-1432 ISSN 1098-5530 (Electronic) Doi: doi:10.1128/JB.01336-09 pubmed:20061472, página 1431, columna 1, [párrafo 3] – columna 2, [párrafo 2]; resumen.	1-27
A	CHRISTIE-OLEZA JOSEPH A et al. <i>ISPst9</i> , an ISL3-like insertion sequence from <i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10 involved in catabolic gene inactivation. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology Spain Jun 2008 06.2008 VOL: 11 No: 2 Págs: 101-110 ISSN 1139-6709 (Print) Doi: pubmed:18645960, página 109, columna 1, [párrafo 2], líneas 1-4; columna 2, [párrafo 1].	1-27
A	CHRISTIE-OLEZA J A et al. Conjugative interaction induces transposition of <i>ISPst9</i> in <i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10. Journal of bacteriology United States Feb 2009 02.2009 VOL: 191 No: 4 Págs: 1239-1247 ISSN 1098-5530 (Electronic) Doi: doi:10.1128/JB.01071-08 pubmed:19060139, resumen.	1-27
A	WILLIAMS PETER A et al. A third transposable element, <i>ISPpu12</i> , from the toluene-xylene catabolic plasmid pWW0 of <i>Pseudomonas putida</i> mt-2. Journal of Bacteriology Diciembre, 2002 12.2002 VOL: 184 No: 23 Págs: 6572-6580 ISSN 0021-9193, página 6578, líneas 1-10; párrafo [2].	1-27

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
24.09.2013

Examinador
M. L. Seriñá Ramírez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/74 (2006.01)**C12N15/78** (2006.01)**C12N15/73** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, XPESP2, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, Bases de Texto completo en inglés en X-Full, Buscadores de Internet.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CHRISTIE-OLEZA J A et al. TnpR encoded by an IS <i>Ppu12</i> isoform regulates transposition of two different ISL3-like insertion sequences in <i>Pseudomonas stutzeri</i> after conjugative interaction. Journal of bacteriology United States Mar 2010 03.2010 VOL: 192 No: 5 Págs: 1423-1432 ISSN 1098-5530 (Electronic) Doi: doi:10.1128/JB.01336-09 pubmed:20061472, página 1431, columna 1, [párrafo 3] – columna 2, [párrafo 2]; resumen.	28.02.2010
D02	CHRISTIE-OLEZA JOSEPH A et al. IS <i>Pst9</i> , an ISL3-like insertion sequence from <i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10 involved in catabolic gene inactivation. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology Spain Jun 2008 06.2008 VOL: 11 No: 2 Págs: 101-110 ISSN 1139-6709 (Print) Doi: pubmed:18645960, página 109, columna 1, [párrafo 2], líneas 1-4; columna 2, [párrafo 1].	31.05.2008
D03	CHRISTIE-OLEZA J A et al. Conjugative interaction induces transposition of IS <i>Pst9</i> in <i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10. Journal of bacteriology United States Feb 2009 02.2009 VOL: 191 No: 4 Págs: 1239-1247 ISSN 1098-5530 (Electronic) Doi: doi:10.1128/JB.01071-08 pubmed:19060139, resumen.	31.01.2009
D04	WILLIAMS PETER A et al. A third transposable element, IS <i>Ppu12</i> , from the toluene-xylene catabolic plasmid pWW0 of <i>Pseudomonas putida</i> mt-2. Journal of Bacteriology Diciembre, 2002 12.2002 VOL: 184 No: 23 Págs: 6572-6580 ISSN 0021-9193, página 6578, líneas 1-10; párrafo [2].	30.11.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El documento D1 se refiere al regulador TnpR, codificado por la secuencia IS*Ppu12* de *Pseudomonas stutzeri* AN10, que regula la transposición de IS*Pst9* e IS*Ppu12*, ambas flanqueadas por repeticiones invertidas prácticamente idénticas.

El documento D2 divulga la función de IS*Pst9* de *P. stutzeri*, su implicación en la inactivación de genes catabólicos y su capacidad de transponerse en múltiples copias.

El documento D3 detalla cómo la interacción conjugativa con *E. coli* induce la transposición de IS*Pst9* en *P. stutzeri* AN10.

El documento D4 describe la inserción de un casete Kmr en IS*Ppu12* de *Pseudomonas putida* mt-2, provocando la transposición a elevada frecuencia al cromosoma de un receptor de *P. putida*.

El documento D1 se considera el estado de la técnica más próximo en relación con la reivindicación 1. La diferencia de la reivindicación 1 respecto a D1 radica en que se describe una construcción génica artificial que comprende las repeticiones invertidas derecha (IRR) e izquierda (IRL) de la secuencia de inserción IS*Pst9* de *P. stutzeri*, mientras que D1 describe dichas IR y su estructura, pero no describe ninguna construcción que las incluya. El objeto de la reivindicación independiente 1 del documento base es por tanto nuevo (Art. 6.1 LP 11/86).

El documento D01 no revela ni tampoco hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en la primera reivindicación del documento base. Por lo tanto, el objeto de la primera reivindicación del documento base cumple también con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/86).

Ninguno de los documentos citados en el IBI, o cualquier combinación relevante de ellos revela una construcción génica que comprenda las secuencias IRR e IRL de *P. stutzeri* tal y como se plantea en la primera reivindicación del documento base. Por lo tanto, los documentos del IET reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, se considera que R1 también implica actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/86).

Las reivindicaciones R2-R15 son dependientes, directa o indirectamente, de la reivindicación R1 y como ella también cumplen los requisitos de novedad (Art. 6.1 LP 11/86) y actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/86).

Las reivindicaciones R16, R23 y R24, se refieren a dos usos distintos y un método, todos ellos basados en la utilización de la construcción génica detallada en la R1. Por tanto, dado que dicha construcción es nueva e inventiva, sus usos y los métodos que la emplean serán, así mismo, nuevos e inventivos (Arts.6,1 y 8,1 LP 11/86). Por el mismo motivo, las reivindicaciones dependientes R17-R22 y R25-R27 son también nuevas e inventivas (Arts. 6,1 y 8.1 LP 11/86).