

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 744**

21 Número de solicitud: 202430387

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.05.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.12.2024

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)
AVENIDA DE SÉNECA, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ESCUDERO GARCÍA-CALDERÓN, José Antonio y
TRIGO DA ROZA MOUTINHO, Filipa**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la
página web de la OEPM para su descarga en
formato electrónico

54 Título: **Herramienta para captar casetes de integrones**

57 Resumen:

Herramienta para captar casetes de integrones.

La invención se refiere a una herramienta para la
captura de casetes de integrones que incluye el gen
de un marcador contraselectivo en el que se ha
insertado un sitio de integración (*attI*) para convertirlo
en un marcador de lectura ciego para seleccionar
eventos de recombinación. La herramienta también
incluye el gen de la integrasa *intI*.

La construcción del marcador contraselectivo con el
sitio *attI* se puede integrar en el cromosoma de una
bacteria, especialmente, de una cepa de *Vibrio*
cholera carente de superintegrón, mientras que el gen
intI se incluye en un plásmido en el que, además,
puede insertarse el gen *tfoX*, regulador de la
competencia natural de *V. cholerae*.

La invención también se refiere a métodos y kits de
detección de casetes de integrones presentes en
otras bacterias, mediante conjugación, y de casetes
de integrones procedentes de muestras de ADN,
mediante transformación natural.

ES 2 991 744 A1

DESCRIPCIÓN

Herramienta para captar casetes de integrones

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología, más concretamente, se refiere a herramientas de biología molecular para la detección de casetes de integrones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los integrones son plataformas genéticas capaces de capturar, almacenar y reorganizar genes codificados en elementos genéticos pequeños denominados casetes de integrón, mediante reacciones de recombinación específica de sitio. Estas estructuras se encuentran de forma natural en el cromosoma de más del 17% de las bacterias secuenciadas y, algunas, a través de su asociación con transposones y plásmidos conjugativos, se han diseminado por ambientes clínicos. A día de hoy, están presentes en aproximadamente el 50% de los aislados clínicos de bacterias Gram negativas, y pueden vehicular una enorme colección de genes de resistencia a antibióticos. De manera general, la parte estable de los integrones está compuesta por 3 elementos clave: el gen de la integrasa (*intI*), que codifica una recombinasa sitio-específica de la familia de las tirosin-recombinasas que lleva a cabo todas las reacciones de recombinación dentro del integrón; el sitio de integración (*attI*) donde se incorporan los casetes de integrón; y un promotor constitutivo (P_c) que permite la expresión de los genes contenidos dentro de los casetes. La parte variable de los integrones está constituida por la colección de casetes, generalmente compuestos por un único marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) seguido de un sitio de recombinación (*attC*) que les permite ser recombinados por la integrasa, dando lugar a su integración y escisión de la plataforma.

La integración sucesiva de casetes en el sitio *attI* lleva a la formación de una colección de genes de funciones adaptativas, donde los más cercanos al P_c se expresan con más intensidad. En condiciones de estrés se expresa la integrasa, que puede escindir y reintegrar casetes en la primera posición, donde la expresión es máxima.

35

Como se ha indicado, los integrones están naturalmente presentes en los cromosomas de más del 17% de los genomas secuenciados disponibles. El paradigma de estos integrones cromosómicos sedentarios (SCI) es el superintegrón (SI) de *Vibrio cholerae*, una estructura masiva que alberga aproximadamente 200 casetes que, en su mayoría, codifican genes de funciones desconocidas. Algunos integrones cromosómicos han sido movilizados a través de transposones a plásmidos conjugativos que los vehiculan por transferencia horizontal; en este caso se conocen como integrones móviles (MI, por sus siglas en inglés). En los años 50, los MI desempeñaron un papel primordial en la aparición y aumento de la multirresistencia a los antibióticos y, en la actualidad, vehiculan más de 170 casetes de resistencia frente a la mayoría de los antibióticos. Se conocen cinco clases de integrones móviles; la clase 1 es la más prevalente y clínicamente relevante, y también la mejor estudiada.

En los últimos años, se han descrito aplicaciones de los integrones o sus elementos como herramientas biotecnológicas. En concreto, se han utilizado los sitios de recombinación *attC* para clonar ADN de interés, incluso de gran tamaño, y se propone la posibilidad de determinar la orientación de los genes diana cuando se inserta el ADN del genoma, por lo que sería útil en terapia génica (CN102517318A). También se ha descrito la creación de sitios *attC de novo* (EP2634256A1), reescribiendo la secuencia primaria de los sitios *attC* para cifrar en ellos una segunda función, o para generar la recombinación entre dominios de proteínas dentro de las proteínas multidominio (WO201809991A1), generando sitios de recombinación sintéticos con secuencias a la medida que pueden insertarse en una región de ADN seleccionada y preservando su funcionalidad.

Sin embargo, a pesar de su importancia, la detección rutinaria de casetes de integrones en microorganismos patógenos sigue siendo compleja. Los métodos clásicos, por reacción de PCR (CN104894283A, CN101948909A, CN106222252A), están basados en secuencias supuestamente conservadas en la región 3' del integrón de clase 1. Los avances en secuenciación masiva han puesto de manifiesto que estas secuencias no se encuentran en gran parte de los integrones de clase 1 (los más comunes), y tampoco están presentes en los integrones de las clases 2 a 5. Por lo tanto, la única forma eficaz de identificar y caracterizar integrones es por secuenciación masiva, un método laborioso y largo de realizar, que requiere de material específico y caro (secuenciadores)

y de personal cualificado para el análisis de los datos, lo que limita su implementación de rutina.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

5

Herramienta para captar casetes de integrones.

10

Para resolver el problema de la falta de herramientas para detectar de forma rutinaria casetes de integrones en bacterias y en muestras de ADN, un aspecto de esta invención se refiere a una herramienta génica de captura de casetes de integrón que incluye un sistema reportero y el gen de la integrasa *intl*.

15

20

La herramienta de captura de casetes de integrones está diseñada a partir de un integrón de clase 1, a la que pertenecen los MI más relevantes desde el punto de vista clínico, y cuya integrasa IntI1 reconoce un espectro más amplio de sitios *attC* de los casetes de integrón que las integrasas de otras clases de integrones. La invención incluye el clonaje de un sitio de integración (*attI*) dentro de un gen de un marcador contraselectivo, con el objetivo de usarlo como un marcador de lectura ciego para seleccionar eventos de recombinación de modo que la supervivencia del microorganismo que porta la construcción evidencie el evento de integración. Después de inducir la expresión de *intl*, los casetes captados interrumpen el gen de este marcador contraselectivo, lo que permite la supervivencia bacteriana. Antes de seleccionar estos eventos de recombinación, el crecimiento en condiciones no tóxicas para este marcador garantiza la viabilidad de la bacteria.

25

30

Para conseguir este reportero, se ha clonado el sitio *attI* dentro del gen de un marcador contraselectivo de manera que, al expresarse, la proteína obtenida no pierda su función normal. Preferentemente, como reportero específico se selecciona el gen *sacB* y, como sitio de integración, se selecciona preferentemente *attI1*. Se ha elegido una zona plástica de *sacB*, que se especifica más adelante, donde introducir 51 bp respetando el marco de lectura no influye en la actividad de la toxina. La expresión de *sacB* da lugar a una enzima que, en presencia de sacarosa, metaboliza este disacárido en glucosa y levan, compuesto este último que es tóxico para un elevado número de bacterias gran negativas.

35

Un aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a una construcción de un reportero ciego que incluye un sitio *attI* insertado en el gen de un marcador contraselectivo, de manera que esa inserción no modifica la funcionalidad de la proteína resultante del gen, y la construcción incluye, además, el gen de la integrasa *intI*. Preferentemente, el
5 marcador contraselectivo utilizado para realizar la construcción es el gen *sacB* por lo que el sitio *attI* se inserta en el gen *sacB* (*sacB::attI*) sin modificar la funcionalidad de la proteína resultante de la traducción del gen *sacB*; la herramienta, además, incluye el gen de la integrasa *intI*. Se seleccionan preferentemente *attI1* e *intI1*.

10 En esta memoria descriptiva, por marcador contraselectivo se entiende un marcador que resulta en una selección negativa, al eliminar o inhibir el crecimiento del organismo hospedador.

Esta herramienta se incluye dentro de una bacteria hospedadora en la que se activará
15 el mecanismo de captación de casetes de integrón con diferentes objetivos, como captar casetes de muestras exógenas tanto de otras bacterias portadoras como de ADN presente en el medio ambiente.

El gen del marcador contraselectivo que incluye el sitio *attI* se introduce en el
20 cromosoma de la bacteria hospedadora de la herramienta, mientras que el gen *intI* se introduce en un plásmido. Por un lado, el gen del marcador contraselectivo está clonado con su promotor constitutivo. Por otro lado, *intI* está bajo el control de un promotor inducible y en un plásmido de alto número de copias. Preferentemente, esta construcción incluye P_{BAD} como promotor de la integrasa. Esta construcción se introduce
25 preferentemente en *V. cholerae*.

En una segunda opción se genera una versión del plásmido que contiene la integrasa que también incluye el gen *tfoX*, el regulador de la competencia natural en *Vibrio cholerae*, fusionado transcripcionalmente con el gen de *intI*, de forma que la inducción
30 de P_{BAD} lleva a la expresión de estos dos genes. Mediante esta construcción, además, se controla mejor la competencia natural de *Vibrio cholerae*.

Por plásmido de alto número de copias, el experto en la materia entiende aquellos que tienen una “replicación relajada” cuyo número puede variar entre 15 y varios cientos de
35 copias.

Sin embargo, la construcción no se puede utilizar directamente en *Vibrio cholerae* porque esta especie cuenta con un superintegrón que interferiría con el objetivo de captar casetes de integrones de muestras externas.

5

Un aspecto de la invención se refiere a una cepa de *Vibrio cholerae* que tiene el SI delecionado, en cuyo cromosoma se ha incluido una construcción de reportero ciego con un marcador contraselectivo y el sitio de integración *attI* insertado en el gen del marcador contraselectivo, sin modificar la funcionalidad de la proteína resultante de la traducción de dicho gen, y que, además, incluye un plásmido que contiene el gen de la integrasa, *intI*. Preferentemente, el marcador contraselectivo es el gen *sacB* (*sacB::attI*).

Además, la invención se refiere a una cepa de *Vibrio cholerae* Δ SI con la construcción del marcador contraselectivo *sacB::attI* tal como se acaba de describir, que incluye un plásmido con el gen *intI* y con el gen *tfoX* fusionado transcripcionalmente con el gen *intI*. Preferentemente, se refiere a la cepa *V. cholerae* N16961 Δ SI con la construcción y el plásmido que se describen en este párrafo, cepa que ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (Parque Científico de la Universidad de Valencia, calle del Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 9, 46980 paterna, Valencia) con fecha 14/04/2024, donde ha recibido el número de referencia CECT31061.

La invención también se refiere a un método de detección de casetes de integrón a partir de una cepa bacteriana bajo estudio utilizando una bacteria hospedadora que contiene la herramienta para captar casetes de integrones y poniendo ambas cepas en condiciones que permitan la conjugación de plásmidos de la cepa bajo estudio a la cepa hospedadora, así como la recombinación de los casetes de integrón presentes en los plásmidos de la cepa bajo estudio en el sitio *attI* de la bacteria hospedadora.

Un segundo método de detección de casetes de integrón permite la detección de dichos casetes a partir de muestras de ADN, utilizando la bacteria hospedadora que contiene la herramienta para captar casetes de integrones y el ADN bajo estudio, mediante transformación. Para realizar este método se ponen en contacto muestras de ADN de cualquier procedencia con la bacteria hospedadora en condiciones que permitan la transformación de la bacteria hospedadora con el ADN de la muestra y la recombinación de los casetes de integrón del ADN bajo estudio en el sitio *attI* de la bacteria

hospedadora.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de casetes de integrón presentes en otras bacterias bajo estudio o bien en muestras de ADN que incluye una
 5 cepa de *V. cholerae* Δ SI con la herramienta para captar casetes de integrones aquí descrita, siendo la cepa preferida *V. cholerae* CECT31061. Opcionalmente, el kit incluye la cepa de *V. cholerae* Δ SI con la herramienta para captar casetes de integrones como células competentes.

10 Las muestras de ADN a analizar pueden ser de origen humano, animal o ambiental y pueden ser clínicas, alimentarias o ambientales, lo que permite analizar la prevalencia y la difusión de los casetes de resistencia a antibióticos y, por lo tanto, comprender la ecología de estos elementos. Por otro lado, al incluir una selección ciega, estas herramientas se pueden utilizar para estudiar el contenido de casetes de integrones en
 15 muestras variadas, analizando su función, ya que se sabe que los integrones cromosómicos son un reservorio virtualmente infinito de casetes de integrón de función desconocida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña, como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

25

Figura 1. Base de la herramienta para la captura de casetes de integrón. Para captar un casete, se induce la expresión de la integrasa (*intI*) y se incuba la bacteria en presencia de sacarosa; la bacteria muere si el gen *sacB* está intacto o sobrevive si un casete de integrón se inserta en el sitio *attI*, interrumpiendo la transcripción del gen *sacB*
 30 que metaboliza la sacarosa dando lugar a un compuesto tóxico.

Figura 2. Esquema de la herramienta para la captura de casetes de integrón y su ruido de fondo. A. Detalles de la plataforma. La construcción *sacB::attI* está clonada en el cromosoma. *intI1* y *tfoX* están clonados bajo el control del promotor P_{BAD} en un
 35 plásmido. **B.** Frecuencia de mutantes de escape (FME) del sistema, comparando la

construcción *sacB::attI1* con el gen silvestre. Los puntos representan resultados de experimentos independientes.

Figura 3. Captura de casetes con la herramienta para la captura de casetes de integrón por conjugación en *V. cholerae* ΔSI. Las frecuencias de recombinación (FR) se obtuvieron calculando el número de recombinantes (seleccionando por fenotipo, color violeta, o por selección ciega con la herramienta de la invención, color azul) sobre el número total de bacterias. En gris se representa el ruido de fondo, que corresponde al número de bacterias que crecen cuando no se conjuga ningún casete. *sacB::attI1* representa la herramienta y *attI* representa un control similar sin el gen de *sacB*. Los puntos representan resultados de experimentos independientes.

Figura 4. Captura de casetes con la herramienta para la captura de casetes de integrón por transformación natural en *V. cholerae* ΔSI. Las frecuencias de recombinación (FR) se obtuvieron calculando el número de recombinantes sobre el número total de bacterias. pppC167, gDNA A096 y gDNA A096 + GTT* representan la frecuencia de captación de casetes de integrones de esas muestras, respectivamente. En gris se representa el ruido de fondo, que corresponde al número de bacterias que crecen cuando no suministramos ninguna muestra que analizar. Los puntos representan resultados de experimentos independientes.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance. Se incluyen, además, tablas con la descripción de los cebadores (tabla 1), los plásmidos (tabla 3) y las cepas (tablas 4) utilizados o generados en estos ejemplos.

En la Figura 1 se representa el clonaje de un sitio de integración (*attI*) dentro del gen de *SacB*, con el objetivo de usarlo como marcador de lectura ciego para seleccionar eventos de recombinación de modo que la supervivencia del microorganismo que porta la construcción evidencie el evento de integración. Después de inducir la expresión de *intI*, los casetes captados interrumpen el gen de *SacB*, lo que permite la supervivencia bacteriana en presencia de sacarosa. Antes de seleccionar estos eventos de recombinación, el crecimiento en medio sin sacarosa garantizan la viabilidad de la

bacteria.

Ejemplo 1. Construcción del reportero ciego.

Se insertó un sitio *attI1* (SEQ ID NO: 17) de *E.coli* en el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*,
 5 generando *sacB::attI1* (SEQ ID NO: 18) por SOE-PCR (del inglés “Splicing by Overlap
 Extension” PCR). Esto se hizo amplificando primero el *attI1* del plásmido pA121 con los
 cebadores SEQ ID 1 y 2, y también dos fragmentos del gen *sacB*, a partir del plásmido
 pC525, con las parejas de cebadores SEQ ID 3 y 4 y SEQ ID 5 y 6, y uniéndolos a
 10 continuación mediante otra PCR con los cebadores SEQ ID 3 y 6, obteniendo *sacB::attI1*
 (SEQ ID NO: 18).

Ejemplo 2. Elaboración de una herramienta para captar casetes de integrones.

En este ejemplo describimos la construcción de la herramienta que incluye *sacB::attI*
 (SEQ ID NO: 18).

15 Para clonar en el hospedador final, en este ejemplo la cepa de *V. cholerae* C536, que
 es una cepa de laboratorio derivada de la cepa B522 (*V. cholerae* N16961 Δ SI,
 registrada en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT30916), se
 amplificaron las regiones adyacentes a la zona del Tn7 del cromosoma 1 de la cepa
 20 C536 para usarlas como regiones de homología en la inserción de nuestras
 construcciones, utilizando los cebadores SEQ ID NO 7 y 8 para la región de homología
 izquierda, y 9 y 10 para la región de homología derecha. También se amplificó un
 marcador de resistencia a zeocina, con los cebadores SEQ ID 11 y 12 proveniente del
 plásmido pA249, para unirlo con el extremo 3' de la región de interés, *sacB::attI* (SEQ
 25 ID NO: 18), amplificada con los cebadores SEQ ID 3 y 6 como se describe en el
 Ejemplo1. Mediante SOE-PCR, se unieron las dos regiones de homología, la región de
 interés y el marcador de selección de resistencia a zeocina con los cebadores SEQ ID
 7 y 10.

30 Después, se introdujo la construcción generada con los cebadores SEQ ID 7 y 10 por
 SOE-PCR de *sacB::attI1* en la cepa huésped, C536, por transformación natural,
 recurriendo al protocolo de Instant Ocean. Brevemente, se inocularon 150 μ L de quitina
 autoclavada (Apollo Scientific) en agua de mar artificial (7 g/litro Instant Ocean
 [Aquarium Systems]) con 100 μ L de bacteria a una densidad óptica de 1 en 750 μ L agua
 35 de mar artificial (7 g/litro Instant Ocean [Aquarium Systems]) y se incubó estáticamente

a 30° C durante 24 h. A continuación, se quitaron 550µL de sobrenadante y se añadieron 2µg del producto PCR a transformar. A continuación, se volvió a incubar estáticamente a 30°C durante 24 h. Por último, se plaquearon las células con el marcador de resistencia de la construcción (zeocina), generando la cepa C869.

5

A continuación, mediante electroporación, se introdujo en la cepa C869 el plásmido pC274, que contiene el gen de la integrasa *intI1* (SEQ ID NO: 19), y el regulador de la competencia natural de *Vibrio cholerae* *tfoX* (SEQ ID NO: 20) generando así la cepa C874, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de referencia

10

CECT31061 (Figura 2A).

Esta construcción se testó con un ensayo de muerte, para garantizar el correcto funcionamiento de la toxina y evaluar el ruido de fondo de la herramienta. Brevemente, la cepa CECT31061 se incubó a 30°C en medio LB con espectinomicina 100µg/mL y glucosa 1% durante la noche. Al día siguiente, se realizaron diluciones seriadas del cultivo que se plaquearon en condiciones de supervivencia (medio LB + espectinomicina 100 µg/mL + glucosa 1%, incubando a 30°C) y en condiciones de muerte (medio LB sin NaCl + sacarosa 10%, incubando a 20°C). Obtuvimos una frecuencia de mutantes de escape (FME) de 10^{-6} (Figura 2B). Por mutantes de escape entendemos el “ruido de fondo”, es decir, las bacterias que sobreviven pero que no han captado ADN en el sitio de integración.

15

20

Ejemplo 3. Método de detección de casetes de integrón por conjugación utilizando la cepa de *V. cholerae* que incluye una herramienta para captar casetes de integrones.

25

Unos de los métodos de detección de casetes de integrón utilizando la herramienta cuya construcción se indica en los ejemplos anteriores, está basado en conjugación de plásmidos que contienen casetes de integrones.

30

En este ejemplo de conjugación, se utilizó el plásmido suicida pA123 que se basa en el plásmido pSW23T con un sitio *attC* y que, por lo tanto, asegura la entrega de uno de los sustratos de recombinación en su forma monohebra, que es su forma recombinogénica (este plásmido con sitio *attC* emula los casetes de integrón). La cepa donadora de pA123 (A123) conjuga el plásmido que entra en la célula receptora, en este ejemplo la cepa CECT31061, en forma de monohebra. Al ser un plásmido suicida, esto es, un

35

plásmido que necesita una determinada proteína (P_i , π) para su replicación, la cepa receptora, CECT31061 que contiene la herramienta descrita en el ejemplo 2, no puede sostener su replicación. La única manera de que se mantenga el vector pA123 en las células receptoras es que recombine con el sitio *attI1* contenido en la herramienta de CECT31061. La eficiencia de la captación del casete se mide calculando la frecuencia de recombinación (FR).

Para la detección de casetes con este método, se cultivó la cepa donadora A123 durante toda la noche en medio LB suplementado con cloranfenicol 25 $\mu\text{g/mL}$ y ácido diaminopimélico (DAP) a 0,3 mM. La cepa receptora CECT31061 (denominada internamente C874) se cultivó durante toda la noche en medio LB suplementado con zeocina 50 $\mu\text{g/mL}$, espectinomycin 100 $\mu\text{g/mL}$ y glucosa 1% (para reprimir la expresión de *intI1*) a 30°C en medio LB. Al día siguiente, el cultivo de la cepa donadora A123 se diluyó 1/100 en LB con cloranfenicol y DAP, como se ha indicado más arriba, y la cepa receptora CECT31061 se diluyó 1/100 en LB con los mismos antibióticos mencionados arriba y arabinosa 0,2% (para inducir *intI1*) a 30°C. Estos cultivos se incubaron hasta una $\text{DO}_{600} = 0,7$. A continuación, después de lavar los cultivos, se mezclaron en 1 mL de volumen total la receptora y la donadora en una proporción de 4:1, centrifugando después 2 min a 7000 rpm, y resuspendiendo en 100 μL de LB. Este volumen se extendió sobre una membrana de conjugación (membrana de éster de celulosa mixta de Millipore, 47 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro) sobre una placa de Petri con LB + DAP 0,3 mM + arabinosa 0,2% y se incubó durante la noche (18 horas) a 30°C para que tuvieran lugar la conjugación y la recombinación. Al día siguiente, se resuspendieron las células contenidas en la membrana en 5 mL de LB, después de lo cual se realizaron diluciones en serie 1:10 hasta 10^{-7} y se sembraron 5 μL de cada dilución en placas en medio LB suplementado con distintos antibióticos y reactivos. Para contar las bacterias receptoras totales se sembró en medio LB con zeocina 50 $\mu\text{g/mL}$ y glucosa 1% incubando a 30°C. Para contar las bacterias recombinantes por el fenotipo conferido por el plásmido suicida integrado, se sembró en medio LB con zeocina 50 $\mu\text{g/mL}$, cloranfenicol 2,5 $\mu\text{g/mL}$ y glucosa 1%, incubando a 30°C. Para contar las bacterias recombinantes por supervivencia por inserción dentro de *sacB*, se sembró en medio LB sin NaCl con sacarosa 10%, incubando a 20°C. La frecuencia de recombinación se calculó como la proporción de unidades formadoras de colonias (UFC) recombinantes, con respecto al número total de UFC receptoras, es decir, de UFC de CECT31061. En este caso, obtuvimos una frecuencia de recombinación (FR) de 10^{-3} en el caso de

detección por fenotipo, y de 10^{-3} en el caso de detección por nuestra herramienta, frecuencias muy similares al control que solo contiene un *attI1* (cepa C650, tabla 3) (Figura 3).

- 5 Estos resultados muestran, por un lado, que la herramienta aquí descrita es capaz de detectar casetes de integrón en el ensayo clásico de recombinación, sin necesidad de saber cuál es el fenotipo que confiere el casete captado y, por otro lado, que la conjugación es útil como forma de detección de casetes de integrón.

10 **Ejemplo 4. Método de detección de casetes de integrón por transformación natural utilizando la cepa de *V. cholerae* que incluye una herramienta para captar casetes de integrones.**

- Otro método de detección de casetes de integrón con la herramienta descrita en el ejemplo 2 se centra en testar directamente muestras de ADN. Para ello, hemos utilizado
15 la bacteria hospedadora CECT31061 que contiene la herramienta para captar casetes de integrones y su capacidad de transformación natural aumentada mediante la expresión del gen *tfoX*.

- Para la detección de casetes con este método, se utilizaron varias muestras de ADN: i)
20 pppC167: un producto de PCR amplificado con los *primers* SEQ ID 13 y 14 del plásmido pC167 que contiene un array de integrón móvil de clase 1 compuesto por dos casetes de resistencia, el casete del gen *aacA61* en primera posición y el casete del gen *catB3* en segunda posición (ambos descritos en Hipólito, A. *et al.* (2023) *Profile and resistance levels of 136 integron resistance genes. npj Antimicrob Resist* 1, 13), en el sentido 5'>3';
25 ii) gDNA A096: una extracción genómica de la cepa A096 que se corresponde con *Vibrio cholerae* N16961 con su superintegrón (179 casetes); y por último iii) gDNA A096 + GTT*: la misma muestra de ADN genómico amplificado con la polimerasa EquiPhi29 (ThermoFisher) con el *primer* GGT* R que enriquece las zonas ricas en secuencia GTTRRY características de los sitios *attC* de los casetes de integrones.

- 30 Para el ensayo de captura de casetes, como cepa receptora de casetes se utilizó la cepa hospedadora de la herramienta de captura de casetes de integrón CECT31061 que se cultivó durante la noche en medio LB suplementado con zeocina 50 µg/mL, espectinomycinina 100 µg/mL y glucosa 1% (para reprimir la expresión de *intI1* y *tfoX*) a
35 30°C en medio LB. Al día siguiente, se diluyó 1/100 en LB con los mismos antibióticos

mencionados arriba y arabinosa 0,2% (para inducir *int11* y *tfoX*) a 30°C durante 4h30'. Después, se inocularon 300µL de cultivo en 400µL de agua de mar artificial (7 g/litro Instant Ocean [Aquarium Systems]) y 300µL de quitina autoclavada (Apollo Scientific). A continuación, se añadieron aproximadamente 2 µg (con excepción de la muestra gDNA A096 + GTT* donde es complicado purificar y medir la concentración de ADN y de la que se añadió el volumen total obtenido, es decir, 15 µL) de las muestras de ADN en tubos diferentes y se incubó estáticamente a 30°C durante 24 h.

Al día siguiente, se resuspendieron las células vortexeando la mezcla durante 30s, después de lo cual se realizaron diluciones en serie 1:10 hasta 10^{-7} y se sembraron 5 µL de cada dilución en placas con medio LB suplementado con los distintos antibióticos y reactivos que se indican a continuación. Para contar las bacterias receptores totales se sembró en medio LB con zeocina 50 µg/mL y glucosa 1% incubando a 30°C. Para contar las bacterias recombinantes por supervivencia por inserción de una de las muestras de ADN utilizadas como casetes dentro de *sacB*, se sembró en medio LB sin NaCl con sacarosa 10%, incubando a 20°C. La frecuencia de recombinación se calculó como la proporción de unidades formadoras de colonias (UFC) recombinantes, con respecto al número total de UFC receptoras, es decir, de UFC de CECT31061. Con respecto a la muestra pppC167 obtuvimos una frecuencia de recombinación (FR) de $2,1 \times 10^{-5}$, en el caso de la muestra gDNA A096 obtuvimos una frecuencia de $3,5 \times 10^{-6}$, y en el caso de la muestra de gDNA A096 + GTT*, obtuvimos una frecuencia de recombinación de $8,9 \times 10^{-6}$. Por último, en el caso del tubo control sin muestra, la frecuencia de detección (o, en este caso, de mutantes de escape) fue de $4,3 \times 10^{-6}$ (Figura 4). Esto nos permitió deducir los potenciales eventos de captación de casetes. Asimismo, la muestra pppC167 parecía claramente positiva, así como la muestra gDNA A096 + GTT*. La muestra gDNA A096, estando por debajo de la frecuencia de mutantes de escape era probablemente negativa. Para confirmar este resultado, se amplificó el contenido de la plataforma *sacB::att11* con los *primers* SEQ ID NO 15 y 16. Una banda de 340 bp significa que no hay ningún casete insertado y una banda más grande significa que tenemos un casete captado. Pudimos confirmar la captura del casete *catB3* en más del 60% de las colonias obtenidas para la muestra pppC167 y pudimos detectar 11 casetes en 21 colonias testadas para la muestra A096 + GTT*. La muestra gDNA A096 era efectivamente negativa.

Tabla 1. Cebadores y secuencias utilizados

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Descripción
attI1 sacB F 1 (SEQ ID NO: 1)	GTCAAAACTTCTGCAAAGCC GATGTTATGGAGCAGCAAC	Amplificar <i>attI1</i> para introducir en <i>sacB</i>
attI1 sacB R 1 (SEQ ID NO: 2)	TCAGCCGTGCGTTTTTTATCC CAACTTTGTTTTAGGGCGAC	Amplificar <i>attI1</i> para introducir en <i>sacB</i>
sacB Tn7 F (SEQ ID NO: 3)	GGGTGTAGCGTCGTAAGCTA GAATTCGGCTTAACCCATGC	Amplificar región 5' de <i>sacB</i> para introducir <i>attI1</i>
sacB attI1 R 1 (SEQ ID NO: 4)	GGCTTTGCAGAAGTTTTTGAC	Amplificar región 5' de <i>sacB</i> para introducir <i>attI1</i>
sacB attI1 F 1 (SEQ ID NO: 5)	GATAAAAAACGCACGGCTGA	Amplificar región 3' de <i>sacB</i> para introducir <i>attI1</i>
sacB zeo R (SEQ ID NO: 6)	CCTCTTACGTGCCGACAATTA TTCGTTCAAGCCGAGATCG	Amplificar región 3' de <i>sacB</i> para introducir <i>attI1</i>
RHE Tn7 F II (SEQ ID NO: 7)	AATGGCCGCATTCAAATCCG	Amplificar región de homología izquierda de la zona del Tn7
RHE Tn7 R II (SEQ ID NO: 8)	TAGCTTACGACGCTACACCC	Amplificar región de homología izquierda de la zona del Tn7
RHD Tn7 F (SEQ ID NO: 9)	GCTTGCTCAATCAATCACCG	Amplificar región de homología derecha de la zona del Tn7
RHD Tn7 R II (SEQ ID NO: 10)	CTCAGTATCGCTGACTTTGG	Amplificar región de homología derecha de la zona del Tn7
Zeo sacB F (SEQ ID NO: 11)	CGATCTCGGCTTGAACGAAT AATTGTCGGCACGTAAGAGG	Amplificar gen de resistencia a zeocina para unir a <i>sacB::attI</i>
Zeo Tn7 R (SEQ ID NO: 12)	CGGTGATTGATTGAGCAAGC CGGATTTGTCCTACTCAGG	Amplificar gen de resistencia a zeocina para unir a <i>sacB::attI</i>
Intl seq F II (SEQ ID NO: 13)	TGGAAACGGATGAAGGCACG	Amplificar contenido de pMBA
GFP seq R II (SEQ ID NO: 14)	AACTGCGCTGGTCAGTTTGG	Amplificar contenido de pMBA
GGT* R	RYYYYA*A*C	Amplificar muestras de ADN para enriquecer el contenido de integrones
sacB attI check F (SEQ ID NO: 15)	ACACTGGAAGTGAAGATGGC	Amplificar contenido de la plataforma <i>sacB::attI</i>
sacB attI check R (SEQ ID NO: 16)	GTGAACAGGTACCATTTGCC	Amplificar contenido de la plataforma <i>sacB::attI</i>
<i>attI1</i> (SEQ ID NO: 17)	CGATGTTATGGAGCAGCAAC GATGTTACGCAGCAGGGCAG TCGCCCTAAACAAAGTTGG	Secuencia del <i>attI1</i>
<i>sacB::attI1</i> (SEQ ID NO: 18)	ATGAACATCAAAAAGTTTGCA AAACAAGCAACAGTATTAACC TTTACTACCGCACTGCTGGC	Fusión del gen <i>sacB</i> con <i>attI1</i>

	AGGAGGCGCAACTCAAGCGT TTGCGAAAGAAACGAACCAA AAGCCATATAAGGAAACATAC GGCATTTCCTCATATTACACGC CATGATATGCTGCAAATCCCT GAACAGCAAAAAAATGAAAAA TATCAAGTTCCTGAATTCGAT TCGTCCACAATTAATAATATC TCTTCTGCAAAAGGCCTGGA CGTTTGGGACAGCTGGCCAT TACAAAACGCTGACGGCACT GTCGCAAACATCACGGCTA CCACATCGTCTTTGCATTAGC CGGAGATCCTAAAAATGCGG ATGACACATCGATTTACATGT TCTATCAAAAAGTCGGCGAAA CTTCTATTGACAGCTGGAAAA ACGCTGGCCGCGTCTTTAAA GACAGCGACAAATTTCGATGC AAATGATTCTATCCTAAAAGA CCAAACACAAGAATGGTCAG GTTTCAGCCACATTTACATCTG ACGGAAAAATCCGTTTATTCT ACACTGATTTCTCCGGTAAAC ATTACGGCAAACAAACACTGA CAACTGCACAAGTTAACGTAT CAGCATCAGACAGCTCTTTG AACATCAACGGTGTAGAGGA TTATAAATCAATCTTTGACGG TGACGGAAAAACGTATCAAAA TGTACAGCAGTTCATCGATGA AGGCAACTACAGCTCAGGCG ACAACCATACGCTGAGAGAT CCTCACTACGTAGAAGATAAA GGCCACAAATACTTAGTATTT GAAGCAAACACTGGAACCTGA AGATGGCTACCAAGGCGAAG AATCTTTATTTAACAAAGCAT ACTATGGCAAAGCACATCAT TCTTCCGTCAAGAAAGTCAAA AACTTCTGCAAAGCCGATGTT ATGGAGCAGCAACGATGTTA CGCAGCAGGGCAGTCGCCCT AAAACAAAGTTGGGATAAAAA ACGCACGGCTGAGTTAGCAA ACGGCGCTCTCGGTATGATT GAGCTAAACGATGATTACACA CTGAAAAAAGTGATGAAACC GCTGATTGCATCTAACACAGT AACAGATGAAATTGAACGCG CGAACGTCTTTAAAATGAACG GCAAATGGTACCTGTTCACT GACTCCCGCGGATCAAAAAT	
--	---	--

	GACGATTGACGGCATTACGT CTAACGATATTTACATGCTTG GTTATGTTTCTAATTCTTTAAC TGGCCCATACAAGCCGCTGA ACAAAACCTGGCCTTGTGTTAA AAATGGATCTTGATCCTAACG ATGTAACCTTTACTTACTCAC ACTTCGCTGTACCTCAAGCG AAAGGAAACAATGTCGTGATT ACAAGCTATATGACAAACAGA GGATTCTACGCAGACAAACA ATCAACGTTTGCGCCAAGCTT CCTGCTGAACATCAAAGGCA AGAAAACATCTGTTGTCAAAG ACAGCATCCTTGAACAAGGA CAATTAACAGTTAACAAATAA	
<i>intl1</i> (SEQ ID NO: 19)	ATGAAAACCGCCACTGCGCC GTTACCACCGCTGCGTTCGG TCAAGGTTCTGGACCAGTTG CGTGAGCGCATACGCTACTT GCATTACAGCTTACGAACCG AACAGGCTTATGTCCACTGG GTTCTGCGCTTCATCCGTTTC CACGGTGTGCGTCACCCGGC AACCTTGGGCAGCAGCGAAG TCGAGGCATTTCTGTCCTGG CTGGCGAACGAGCGCAAGGT TTCGGTCTCCACGCATCGTC AGGCATTGGCGGCCTTGCTG TTCTTCTACGGCAAGGTGCT GTGCACGGATCTGCCCTGGC TTCAGGAGATCGGAAGACCT CGGCCGTGCGGGCGCTTGC CGGTGGTGCTGACCCCGGAT GAAGTGTTTCGCATCCTCGG TTTTCTGGAAGGCGAGCATC GTTTGTTGCCCAGCTTCTGT ATGGAACGGGCATGCGGATC AGTGAGGGTTTGCAACTGCG GGTCAAGGATCTGGATTTCTG ATCACGGCACGATCATCGTG CGGGAGGGCAAGGGCTCCA AGGATCGGGCCTTGATGTTA CCCGAGAGCTTGGCACCCAG CCTGCGCGAGCAGCTGTCGC GTGCACGGGCATGGTGGCTG AAGGACCAGGCCGAGGGCC GCAGCGGCGTTGCGCTTCCC GACGCCCTTGAGCGGAAGTA TCCGCGCGCCGGGCATTCTT GGCCGTGGTTCTGGGTTTTT GCGCAGCACACGCATTTCGAC CGATCCACGGAGCGGTGTCG	Secuencia del gen <i>intl1</i>

	TGCCTCGCCATCACATGTAT GACCAGACCTTTTCAGCGCGC CTTCAAACGTGCCGTAGAAC AAGCAGGCATCACGAAGCCC GCCACACCGCACACCCTCCG CCACTCGTTTCGCGACGGCCT TGCTCCGCAGCGGTTACGAC ATTCGAACCGTGCAGGATCT GCTCGGCCATTCCGACGTCT CTACGACGATGATTTACACG CATGTGCTGAAAGTTGGCGG TGCCGGAGTGCGCTCACCGC TTGATGCGCTGCCGCCCTC ACTAGTGAGAGGTAG	
<i>tfoX</i> (SEQ ID NO: 20)	ATGAATGAGCAACAGTTTTTC GACTACGTAAGTTTGGC GCCTACCAAAAACGCTCGAT GTTTGGTGGTATTGGCTTGTT TCAACACGACGCTATGTATGT GTTGGTCAGTGAAGACCGCA TTTTTGTGCGTGGTGGAGAA GAGCTCGACCCTGAGCTCTT GGCCTTAGGGTGCGAGAAAT ATCGCCATGTTAAAAACAGA CAACGGCAACCGTAACTATT ACGACATCACTGAACTGTATG AGCAACATCACCTGAGCTA GACTCGATTATTGAACGCTC GATTCAGTTTTCTGTGAATCA GCGGGAATTTCAACGCTCAG CAGCCAGTCGTCGTCTACGG GATTTACCCAATATGCAACTG ACTTTGGAGCGTATGGTAAAA AAAGCGGGCATTGACGATGT GGAAACTTTTATGAGCCTCG GTGCGCCAGAAGTGTTAAT AAGGTGCGTCAAGCTTATGG AAGTGATGTCGATGTAAACT ACTGTGGAAGTTTGCGGGTG CGATTGAAGGCATTCACTGG AAACTGCTGCAAGAGCCGCG TAAGCGCCAACTGTTAGAAA GTTGTCAGCAGCGTTAA	Secuencia del <i>tfoX</i> de <i>Vibrio cholerae</i>

* En el cebador GGT* R, los asteriscos representan enlaces fosforotioato, las bases R purinas y las bases Y pirimidinas.

Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados

Nombre	Descripción	Propiedades	Referencia
pA121	pSU38::attI1	ori _{p15a} ; [Kana ^R]	Colección de laboratorio
pA123	pSW23T::attC _{aadA7}	oriV _{R6KY} , oriT _{RP4} ; [Cm ^R]	PMID: 27496283
pA249	pMBA1	ori _{p15A} ; [Zeo ^R]	Colección del laboratorio
pC167	pMBA1::aacA61 catB3	ori _{p15A} ; [Zeo ^R]	Colección del laboratorio
pC274	pBAD18::intI1 tfoX	oriColE1; [Spec ^R]	Esta invención
pC525	pGP704-Sac28ΔddmDE	oriV _{R6KY} , oriT _{RP4} ; [Amp ^R]	Colección de laboratorio

Tabla 3. Cepas utilizadas y generadas

Nombre	Descripción	Referencia
A906	<i>V. cholerae</i> N16961	Colección de laboratorio
A123	<i>E. coli</i> β2163 donadora para conjugación (F-) RP4-2-Tc::Mu ΔdapA::(erm-pir) [Km ^R Em ^R] /pSW23T::attC aadA7	PMID: 15748991
B522	<i>V. cholerae</i> N16961 ΔSI	Colección de laboratorio CECT30916
C536	<i>V. cholerae</i> N16961 ΔSI ΔddmABC ΔddmDE	Colección de laboratorio derivado de CECT30916
C650	<i>V. cholerae</i> N16961 ΔSI ΔddmABC ΔddmDE /pBAD18:: intI1 tfoX	Esta invención
C869	<i>V. cholerae</i> N16961 ΔSI ΔddmABC ΔddmDE Tn7::sacB::attI1	Esta invención
C874	<i>V. cholerae</i> N16961 ΔSI ΔddmABC ΔddmDE Tn7::sacB::attI1 /pBAD18:: intI1 tfoX	Esta invención CECT31061

REIVINDICACIONES

1. Herramienta para captar casetes de integrones que incluye un sitio *attI* insertado en el gen de un marcador contraselectivo y el gen de la integrasa *intI*, donde el sitio de integración *attI* está insertado en el gen del marcador contraselectivo sin modificar la funcionalidad de la proteína que codifica dicho gen.
2. Herramienta para captar casetes de integrones según la reivindicación 1 en la que el sitio de integración es *attI1*.
3. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el gen del marcador contraselectivo es *sacB*.
4. Herramienta para captar casetes de integrones según la reivindicación 3 en la que el gen del marcador contraselectivo *sacB* está clonado con su promotor constitutivo.
5. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en la que el gen *sacB* con el sitio de integración *attI* insertado se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 18.
6. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el gen que codifica el marcador contraselectivo y tiene el sitio de integración *attI* insertado está incluido en el cromosoma de una bacteria hospedadora.
7. Herramienta para captar casetes de integrones según la reivindicación 6 en la que la bacteria hospedadora es una cepa de *Vibrio cholerae* que carece de superintegrón.
8. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el gen *intI* está incluido en un plásmido.
9. Herramienta para captar casetes de integrones según la reivindicación 8 que, además del gen *intI*, incluye el gen *tfoX* en el mismo plásmido.
10. Herramienta para captar casetes de integrones según la reivindicación 9 en la que

el gen *tfoX* se corresponde con la secuencia SE ID NO: 20.

11. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 en la que el gen *tfoX* está fusionado transcripcionalmente con el gen *intl*.

12. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones 8-11 en la que el plásmido donde está incluido el gen *intl* es de alto número de copias.

13. Herramienta para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones 8-12 en la que *intl* está bajo el control de un promotor inducible.

14. Herramienta para captar casetes de integrones según la reivindicación 13 en la que el promotor inducible es P_{BAD}.

15. Bacteria hospedadora que incluye una herramienta como la descrita en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

16. Bacteria hospedadora de la especie *Vibrio cholerae* depositada con la referencia CECT31061.

17. Método de detección de casetes de integrón de una cepa bacteriana bajo estudio que incluye poner en contacto la cepa bajo estudio con la bacteria hospedadora definida en cualquiera de las reivindicaciones 15-16 en condiciones que permitan la conjugación de plásmidos de la cepa bajo estudio y la recombinación de los casetes de integrón de la cepa bajo estudio en el sitio *attI* de la bacteria hospedadora.

18. Método de detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye poner en contacto la muestra de ADN bajo estudio con la bacteria hospedadora definida en cualquiera de las reivindicaciones 15-16 en condiciones que permitan la transformación de la bacteria hospedadora con el ADN de la muestra y la recombinación de los casetes de integrón del ADN bajo estudio en el sitio *attI* de la bacteria hospedadora.

19. Kit para la detección de casetes de integrón en bacterias bajo estudio que incluye

cualquiera de las bacterias definidas en las reivindicaciones 15-16.

20. Kit para la detección de casetes de integrón en bacterias bajo estudio según la reivindicación 19 en el que las bacterias hospedadoras que incluyen la herramienta de
5 captación de casetes de integrón son células competentes.

21. Kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye cualquiera de las bacterias definidas en las reivindicaciones 15-16.

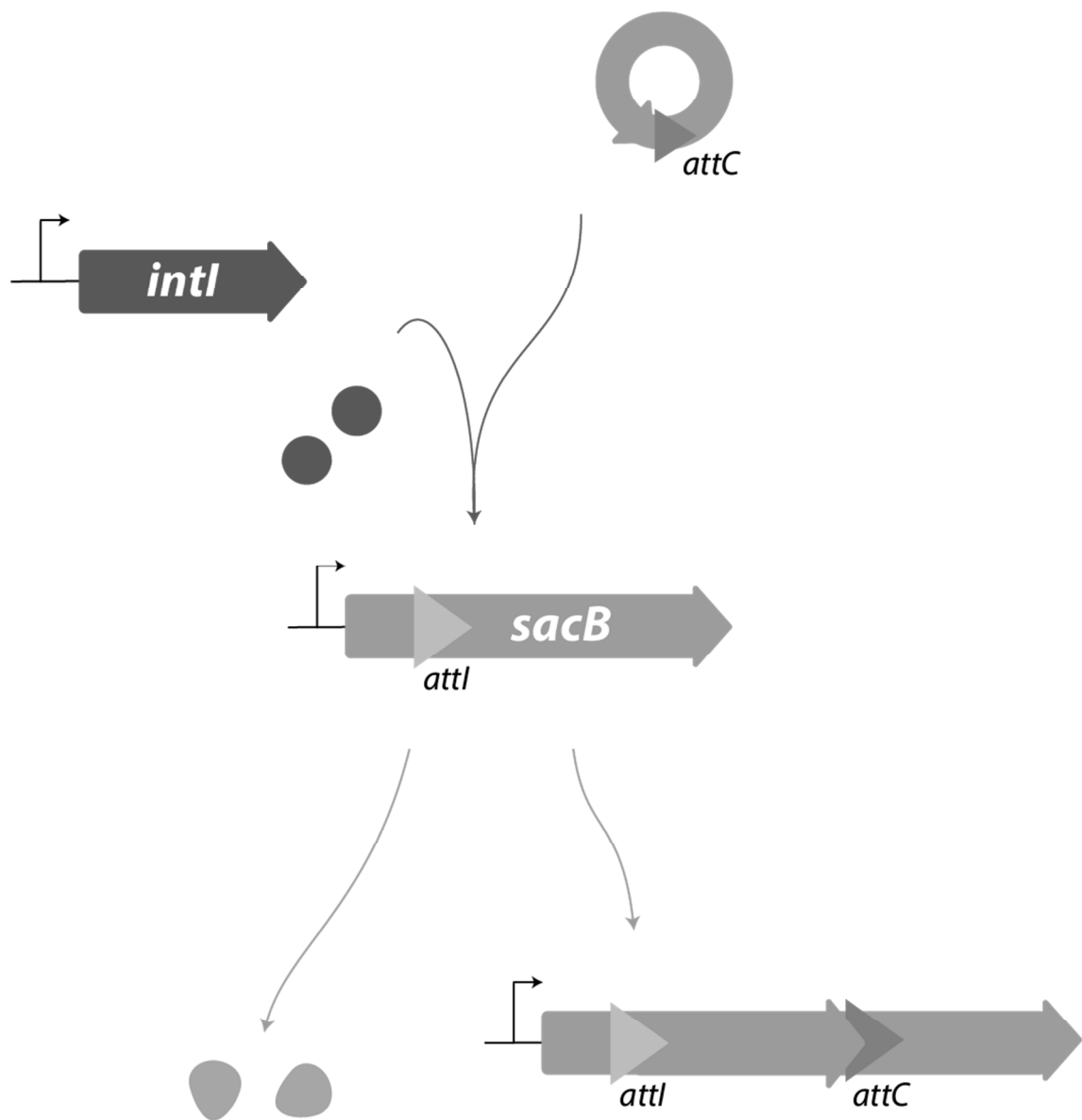
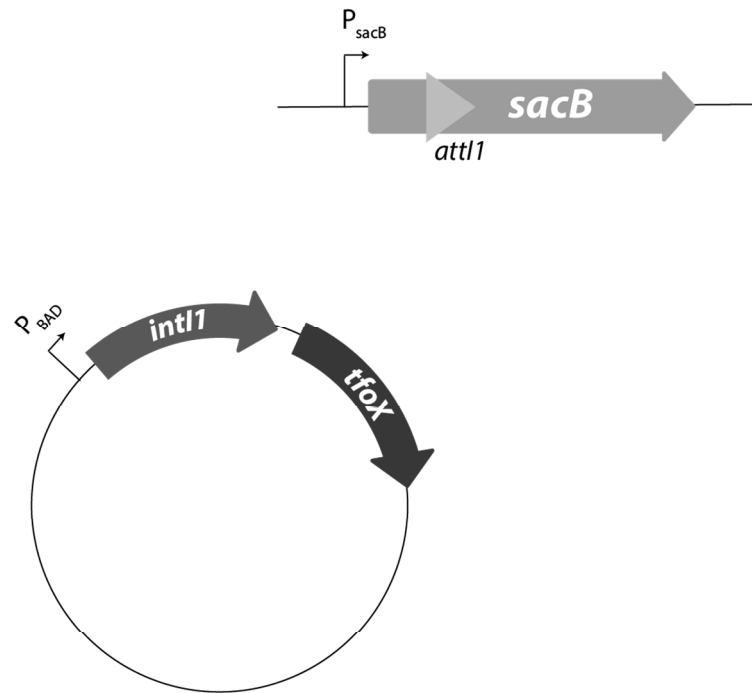


Fig. 1

A



B

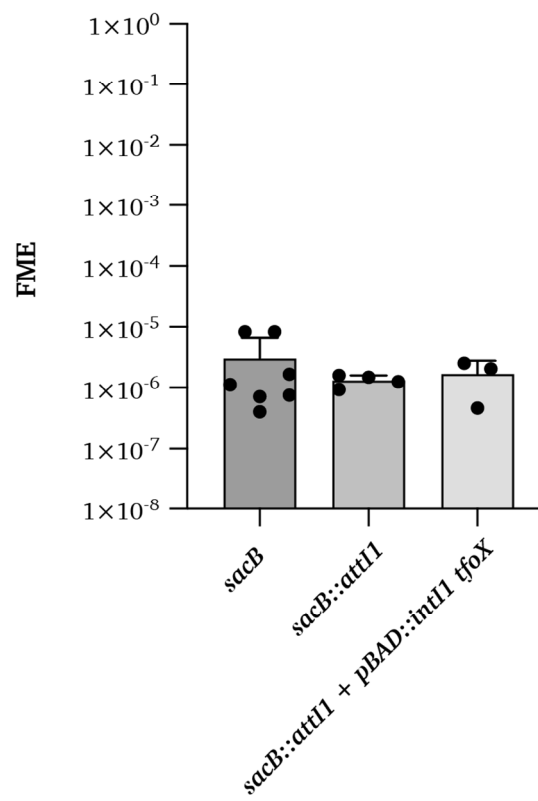


Fig. 2

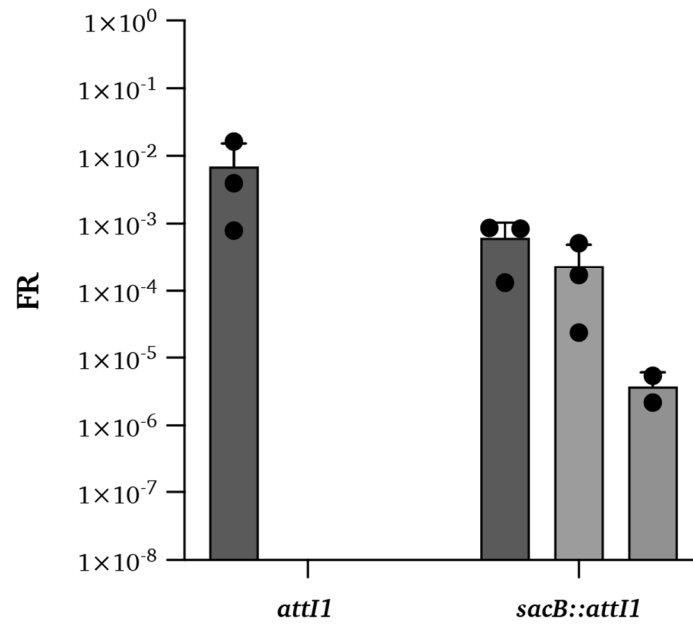


Fig. 3

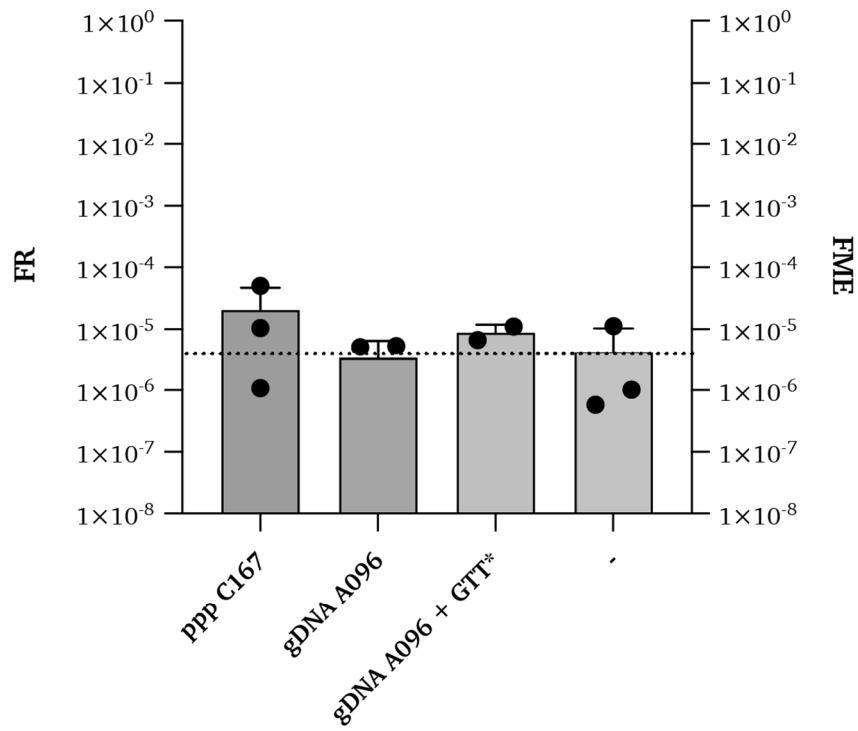


Fig. 4



21 N.º solicitud: 202430387
22 Fecha de presentación de la solicitud: 16.05.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 101503670 A (UNIV FUDAN AF HUASHAN HOSPITAL) 12/08/2009, todo el documento.	1-21
A	COLEMAN, NICHOLAS V. et al. "The native <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain Q chromosomal integron can capture and express cassette-associated genes." Microbiology, (2005), Vol. 151, Nº Pt 6, Páginas 1853 - 1864, ISSN 1350-0872 (Print), <DOI:10.1099/mic.0.27854-0>. todo el documento.	1-21
A	QI, QIN et al. "Identification of integrons and gene cassette-associated recombination sites in bacteriophage genomes." Frontiers in Microbiology, (2023), Vol. 14, artículo nº: 1091391, ISSN 1664-302X (Print), <DOI:10.3389/fmicb.2023.1091391>. todo el documento.	1-21
A	COLLIS, CHRISTINA M et al. "Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site." Molecular Microbiology, (2002), Vol. 46, Nº 5, Páginas 1415 - 1427, ISSN 0950-382X (Print), < DOI:10.1046/j.1365-2958.2002.03260.x >. todo el documento.	1-21
A	YU, GUANGCHAO et al. "Detection on integron carried gene cassettes from pathogens by loop mediated isothermal amplification assays." Microbial Pathogenesis, (2017), Vol. 107, Páginas 304 - 308, ISSN 1096-1208 (Electronic), <DOI: 10.1016/j.micpath.2017.04.006>. todo el documento.	1-21
A	IntegronFinder, (2017) [en línea] [recuperado el 30/04/2024]. Recuperado de Internet <URL: https://github.com/gem-pasteur/Integron_Finder>. todo el documento.	1-21

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 25.11.2024	Examinador M. Hernández Cuéllar	Página 1/2
--	--	---------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

- C12N1/20 (2006.01)
- C12N1/21 (2006.01)
- C12N15/11 (2006.01)
- C12N15/63 (2006.01)
- C12N15/74 (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, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE