

## REIVINDICACIONES

1. Un transposón para suministrar parcialmente la maquinaria transcripcional del hospedero durante análisis funcionales de librerías genómicas/metagenómicas, donde el transposón está caracterizado porque comprende:
  - (i) un marcador de selección, diferente de aquel que está localizado en el vector esqueleto, el cual es el gen de resistencia a kanamicina, incluyendo tanto su promotor como su señal de terminación transcripcional, y que comprende la secuencia SEQ ID N° 5;
  - (ii) un gen que codifica la T7RNA polimerasa bajo un promotor inducible, donde dicho promotor inducible para el gen que codifica la T7RNA polimerasa es el promotor inducible con arabinosa ( $P_{BAD}$ ), y que comprende la secuencia SEQ ID N° 8;
  - (iii) dos promotores flanqueantes T7 de lectura hacia el exterior; y
  - (iv) dos sitios flanqueantes de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA,donde cada uno de los dos sitios flanqueantes de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA se encuentra adyacente a un promotor individual T7 de lectura hacia el exterior.
2. Un vector artificial que contiene el transposón de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho vector es el resultado de la combinación específica de los siguientes elementos de ADN:
  - (i) un vector esqueleto con un origen de replicación de alto número de copias y un marcador de selección, donde el vector esqueleto tiene origen de replicación ColE1/pMB1/pBR322/pUC y un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección;
  - (ii) un marcador de selección diferente de aquel que está localizado en el vector esqueleto, el cual es el gen de resistencia a kanamicina,

incluyendo tanto su promotor como su señal de terminación transcripcional, y que comprende la secuencia SEQ ID N° 5;

- iii) un gen que codifica la T7RNA polimerasa bajo un promotor inducible, donde dicho promotor inducible es el promotor inducible con arabinosa ( $P_{BAD}$ ), y que comprende la secuencia SEQ ID N° 8;
- iv) dos secuencias flanqueantes promotoras T7 de lectura hacia el exterior; y
- v) dos sitios flanqueantes de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA,

donde cada uno de los dos sitios de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA se encuentra adyacente a un promotor individual T7 de lectura hacia el exterior.

3. El vector artificial de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho vector puede ser mantenido en una célula hospedera bacteriana.
4. Una secuencia artificial de ADN para localizar un sitio de unión MuA y un promotor T7 en hebras diferentes de ADN de conformidad con el transposón de la reivindicación 1, caracterizada porque comprende:

- (i) una secuencia promotora T7;
- (ii) un sitio de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA; y
- (iii) múltiples sitios flanqueantes de reconocimiento para endonucleasas de restricción,

donde dicho sitio de unión MuA corresponde a un sitio de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa, y donde dicha secuencia de ADN artificial incluye la secuencia promotora T7 para la interacción específica con la T7RNAP y los siguientes sitios flanqueantes de reconocimiento para endonucleasas de restricción: *EcoRI*, *BglII*, *Ascl* and *BamHI*,

y donde dicha secuencia de ADN artificial comprende la secuencia SEQ ID N° 3.

5. Un método para la construcción del transposón de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
  - a) construir una secuencia artificial de ADN para localizar un sitio de unión MuA y un promotor T7 en hebras diferentes de ADN, donde la secuencia artificial de ADN comprende una secuencia promotora T7, un sitio de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA, y múltiples sitios flanqueantes de reconocimiento para endonucleasas de restricción;
  - b) construir un primer plásmido que comprende un vector esqueleto con el origen de replicación ColE1/pMB1/pBR322/pUC y un gen de resistencia a ampicilina para su selección después de la transformación del hospedero bacteriano, y donde el plásmido está construido por la clonación de la secuencia artificial de ADN del paso a) en los sitios únicos de restricción *EcoRI* y *BamHI*, posterior al tratamiento con enzimas de restricción tanto del vector esqueleto como de la secuencia artificial de ADN;
  - c) construir un segundo plásmido que comprende las mencionadas regiones de ADN del primer plásmido [paso b)], más un gen de resistencia adicional, y donde dicho segundo plásmido está construido por la clonación del gen de resistencia a kanamicina, incluyendo tanto su promotor como su señal de terminación transcripcional, dentro de los sitios de restricción *Ascl* y *BamHI* del primer plásmido [paso b)];
  - d) construir un tercer plásmido, el cual comprende el origen de replicación ColE1/pMB1/pBR322/pUC, un gen de resistencia a cloranfenicol y la secuencia codificante de la T7RNAP, esta última clonada en el sitio único de restricción *KpnI*, y donde dicho tercer plásmido tiene la secuencia codificante de la T7RNAP localizada corriente abajo del promotor inducible con arabinosa y corriente arriba de los terminadores transcripcionales rrnB T1 y T2;

- e) construir un cuarto plásmido, como resultado de la combinación específica de componentes del segundo y tercer plásmidos, y donde dicho cuarto plásmido resulta de la clonación del promotor inducible con arabinosa y la secuencia que codifica la T7RNAP en el sitio único de restricción *Ascl* del segundo plásmido entre la secuencia artificial del paso a) y la secuencia de ADN de resistencia a kanamicina en el vector artificial;
  - f) construir un quinto plásmido, el cual comprende todos los elementos estructurales del cuarto plásmido más un segundo extremo del transposón, donde dicho segundo extremo del transposón está clonado específicamente en el sitio único de restricción *HindIII*; y
  - g) liberar el transposón a través del tratamiento de la enzima de restricción *BglII* sobre el quinto plásmido.
6. Un vector artificial resultado de la inserción aleatoria del transposón de la reivindicación 1, que comprende:
- (i) un vector esqueleto con su propio marcador de selección y un gen reportero silenciado, donde dicho vector esqueleto comprende la secuencia SEQ ID N° 14; y
  - (ii) una inserción diferencial del transposón de las reivindicaciones 1 a 4 a lo largo de la secuencia de ADN de (i).
7. El vector artificial de la reivindicación 6, el cual corresponde a uno de los ocho plásmidos resultantes de las inserciones aleatorias del transposón TnC\_T7 de acuerdo con la reivindicación 1 en el plásmido pKR-C12.
8. Un método para aumentar la transcripción de ADN como paso inicial de la expresión de genes foráneos, caracterizado porque comprende:
- a) generar librerías de transposición de ADN episomal, como resultado de la inserción aleatoria del transposón TnC\_T7 purificado de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho ADN episomal incluye plásmidos, fósquidos, cósmidos o BACs; e,

- b) introducir dichas librerías de transposición de ADN episomal de (i) dentro de células hospederas;
- c) expresar la T7RNA polimerasa codificada en el transposón TnC\_T7, para generar poblaciones de células hospederas bacterianas con colecciones diversas de transcriptos derivados de ADN episomal; y
- d) analizar dichas poblaciones de células hospederas bacterianas para identificar los aislados bacterianos que expresan un gen reportero o cualquier otra función deseada.