

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0600263-3 A**



(22) Data de Depósito: 18/01/2006  
(43) Data de Publicação: 30/10/2007  
(RPI 1921)

**(51) Int. Cl.:**  
**C12N 9/02 (2007.10)**  
**C12N 15/53 (2007.10)**  
**C12Q 1/66 (2007.10)**

**(54) Título: LUCIFERASE DE MACROLAMPIS SP  
COMO GENE REPÓRTER DUAL EM BIOSENSORES  
SIMULTÂNEOS DE EXPRESSÃO GÊNICA E  
VARIÇÕES DE INTRACELULARES DE PH,  
CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO E CÁTIOS  
DIVALENTES DE METAIS PESADOS**

(71) Depositante(s): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR/SP)

(72) Inventor(es): Vadim Viviani

(74) Procurador: Ednéa Casagrande Pinheiro

(57) Resumo: LUCIFERASE DE MACROLAMPIS SP COMO GENE REPÓRTER DUAL EM BIOSENSORES SIMULTÂNEOS DE EXPRESSÃO GÊNICA E VARIÇÕES DE INTRACELULARES DE PH, CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO E CÁTIOS DIVALENTES DE METAIS PESADOS. Trata-se a presente invenção de um produto da área de biotecnologia constituído de Luciferase de Microlampis SP recombinante apresenta espectro de bioluminescência bimodal e sensibilidade elevada a mudanças de pH- e temperatura, como gene repórter dual que codifica uma proteína bioluminosa para uso em biosensores simultâneos de expressão gênica e variações de intracelulares de PH, com concentrações de Fosfato e Cátions divalentes de metais pesados, e presença de ATP e como biosensor intracelular de mudanças de pH e outras condições homeostáticas.

**“LUCIFERASE DE *MACROLAMPIS* SP COMO GENE REPÓRTER DUAL EM BIOSENSORES SIMULTÂNEOS DE EXPRESSÃO GÊNICA E VARIAÇÕES DE INTRACELULARES DE PH, CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO E CÁTIONS DIVALENTES DE METAIS PESADOS”**

05-

Refere-se a presente invenção de um produto da área de biotecnologia constituído de Luciferase de *Microlampis* SP como gene repórter dual que codifica uma proteína bioluminosa para uso em biosensores simultâneos de expressão gênica e variações de intracelulares de PH, com concentrações de Fosfato e Cátions divalentes de metais pesados, e como gene repórter para estudos de expressão gênica em células e tecidos.

10-

15-

A Luciferase recombinante apresenta espectro de bioluminescência bimodal e sensibilidade elevada a mudanças de pH- e temperatura. Por causa destas características de sensibilidade ao pH e temperatura, esta Luciferase é objeto de patente como gene repórter dual para análises simultâneas de expressão gênica e presença de ATP e como biosensor intracelular de mudanças de pH e outras condições homeostáticas.

20-

25-

As luciferases são as enzimas que catalizam a produção de bioluminescência em diferentes organismos. Elas catalizam a oxidação de moléculas genericamente conhecidas por luciferinas produzindo um fóton de luz visível com alta eficiência (Viviani, 2002). As luciferases de vaga-lumes e outros besouros catalizam a oxidação de uma luciferina benzotiazólica ativada por ATP.

30-

Numa primeira etapa estas luciferases catalizam a ativação da luciferina as custas de ATP, produzindo adenilato de luciferina. Na segunda etapa, o adenilato de luciferina é oxidado

por oxigênio molecular produzindo oxiluciferina, dióxido de carbono e um fóton de luz na faixa verde-amarela do espectro com uma eficiência quântica de ca 90%.

05- Devido à sensibilidade do sistema luciferina-luciferase de vaga-lumes ao ATP, este sistema tem sido utilizado para fins de detecção luminométrica de ATP em amostras biológicas e ensaios enzimáticos (Campbell, 1988). Mais recentemente, com a clonagem do cDNA que codificam a luciferase de vaga-lumes, o gene que codifica a luciferase tem sido utilizado como um dos 10- mais versáteis e eficientes genes repórter para estudo de expressão gênica em bactérias, leveduras, plantas e mamíferos (Greer and Szalay, 2002; Contag and Bachmann, 2002). Baseado neste princípio, os genes de luciferases são utilizados para analisar e quantificar a ativação de promotores em diferentes tipos 15- celulares, como marcadores da transformação e transfecção de células por vetores plasmidiais e virais, como marcadores da progressão e regressão de infecções bacterianas, micóticas e virais (Contag and Bashmann, 2002) em estudos clínicos e testes para 20- drogas antimicrobicas, em estudos de progressão e regressão de câncer (Yu et al., 2003), como biosensores *de agentes* tóxicos tais quais agrotóxicos e metais pesados no meio ambiente (Greer and Szalay, 2002), entre muitas outras aplicações biotecnológicas e biomédicas. Entretanto, toda essa variada gama de aplicações tem utilizado principalmente o gene da luciferase do vaga-lume norte- 25- americano *Photinus pyralis*, que produz luz verde amarelada em condições fisiológicas, e alguns de seus variantes produzidos por engenharia genética.

Embora compartilhe alto grau de identidade com a luciferase de *Photinus pyralis*, a luciferase de *Macrolampis* é 30- única em sua seqüência de DNA e de aminoácidos e por apresentar propriedades espectrais diferenciais que a tornam

potencialmente útil como gene repórter em biosensores para mudanças físico-químicas intracelulares como mudanças de pH, concentração de fosfato e metais pesados, utilizando o parâmetro espectral além do parâmetro de intensidade.

- 05- Embora as luciferases de vaga-lumes já sejam amplamente empregadas como genes repórter da expressão gênica, utilizando o parâmetro intensidade de luz para quantificação, nenhuma destas luciferases até o momento utilizou a propriedade da sensibilidade espectral ao pH e outras condições físico-químicas para analisar mudanças homeostáticas intracelulares.

10- A Luciferase de *Macrolampis* SP é utilizada para fins bioanalíticos de detecção e quantificação de ATP e contaminação microbiológica de amostras várias, através da medida luminométrica ou fotográfica da bioluminescência.

- 15- **Descrição do invento**

Clonagem do cDNA para a luciferase de *Macrolampis*.

DNA para a luciferase de *Macrolampis* foi clonado conforme descrito.

- 20- O RNA total foi extraído de 6 lanternas de *Macrolampis* adulto com Trizol. Em seguida, o RNAm foi isolado utilizando resina de oligo dT. O RNAm foi utilizado para a construção da primeira e segunda fita de cDNA utilizando kit Time Saver cDNA synthesis kit da Amersham. O cDNA foi então ligado ao vetor lambda ZAP, gerando uma biblioteca de cDNA.
- 25- Esta biblioteca na forma fago foi amplificada a seguir utilizada para produzir uma biblioteca na forma de plasmídeo através de um processo de excisão in vivo, conforme descrito no manual do fabricante (STRATAGENE).

- 30- A biblioteca na forma de plasmídeo foi transformada em bactérias SOLR. As colônias de bactérias foram crescidas durante a noite a 37C em placas com meio LB e Ampicilina e no

dia seguinte réplicas foram obtidas em membranas de nitrocelulose e transferidas para placas LB/ampicilina contendo IPTG para expressão de proteínas durante 12 h a temperatura ambiente. As placas foram então borrifadas com solução de luciferina acida para a indução de bioluminescência. As colônias brilhantes foram então selecionadas por fotodeteção visual.

05-

A colônia brilhante isolada foi repicada e então o plasmídeo extraído conforme técnicas descritas e submetido a seqüenciamento do cDNA para a luciferase de *Macrolampis* sp2., conforme técnicas descritas.

10-

15-

20-

25-

30-

CTCCCGGGCTGCCTGAATCGCGGCCGCTGTAACGCGCT  
GGTACTATTGTAAAGATGGAAGACGAAAAAACATAA  
TACACGGCCCGGAGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGA  
ACTGCCGGAGAGCAATTGCATAAGGCGATGAAAAGAT  
ATGCCCTAGTTCCAGGAACGATTGCCTTTACGGATGCG  
CATATCGAGGTAAATATCACGTACGCCGAATATTTTGA  
AATGTCCTGTCGATTAGCCGAAGCTATGAANAGGTATG  
GGCTTGGTTTAAAACACAGAATCGTTGTCTGCAGTGAA  
AACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTATTAGGCGCGTTA  
TTTATTGGAGTTGCACTTGCGCCCGCAAATGACATTTAT  
AACGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGACCATTTTCGCA  
GCCACCATAGTGTTCTGCTCCAAAAGGGACTGCAAA  
AGATTTTGAACGTACAAAAAAAATTACCCGTCATCCAA  
AAAATTGTGATCATGGATTCCAAACCGGATTACCAAGG  
GTTCCAGTCCATGTACACATTCATTGAGTCCCATTACC  
TCAAGGCTTTAATGAATATGACTTCGTACCGGATTCCTT  
TGATCGTGATGCAACAATTGCACTTATAATGAACTCCT  
CTGGATCTACTGGGTTACCTAAGGGCGTGGCGCTTCCG  
CATAAAAATGCCTGTGTAAGATTCTCGCATGCCAGAGA  
TCCTATTTATGGCAATCAAATCATTCCCGATACCGCTAT

TTTAAGTGTGGTTCCTCCATCATGGTTTTGGAATGTT  
CACAACCCTCGGATATCTGATATGCGGATTCGTGTTAT  
TTTGATGTACAGATTTGAAGAAGAGTTGTTTTTACGATG  
TCTTCAGGATTACAAAATTCAAAGTGCGATATTAGTAC  
05- CCACGCTATTTTCGTTTTTTGCCAAAAGTACTCTGATAG  
ACAAATACGACTTGTCTAATTTGCACGACTCCCGGGCT  
GCCTGAATCGCGGCCGCTGTAACGCGCTGGTACTATTG  
TAAAGATGGAAGACGAAAAAACATAATACACGGCCC  
GGAGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGAAGTCCCGGAG  
10- AGCAATTGCATAAGGCGATGAAAAGATATGCCCTAGTT  
CCAGGAACGATTGCCTTTACGGATGCGCATATCGAGGT  
AAATATCACGTACGCCGAATATTTTGAAATGTCCTGTC  
GATTAGCCGAAGCTATGAANAGGTATGGGCTTGGTTTA  
AAACACAGAATCGTTGTCTGCAGTGAAAAGTCTCTTCA  
15- ATTCTTTATGCCGGTATTAGGCGCGTTATTTATTGGAGT  
TGCACTTGCGCCCGCAAATGACATTTATAACGAACGTG  
AATTGCTCAACAGTATGACCATTCGCAGCCCACCATA  
GTGTTCTGCTCCAAAAAGGGACTGCAAAAAGATTTTGAA  
CGTACAAAAAAATTACCCGTCATCCAAAAAATTGTGA  
20- TCATGGATTCCAAACCGGATTACCAAGGGTTCCAGTCC  
ATGTACACATTCATTGAGTCCCATTACCTCAAGGCTTT  
AATGAATATGACTTCGTACCGGATTCCTTTGATCGTGA  
TGCAACAATTGCACTTATAATGAACTCCTCTGGATCTA  
CTGGGTTACCTAAGGGCGTGGCGCTTCCGCATAAAAAT  
25- GCCTGTGTAAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTA  
TGGCAATCAAATCATTCCCGATACCGCTATTTAAGTG  
TGGTTCCTCCATCATGGTTTTGGAATGTTCAACCC  
TCGGATATCTGATATGCGGATTCGTGTTATTTTGATGT  
ACAGATTTGAAGAAGAGTTGTTTTTACGATGTCTTCAG  
30- GATTACAAAATTCAAATGCGATATTAGTACCCACGCTA  
TTTTCGTTTTTTGCCAAAAGTACTCTGATAGACAAATAC

GACTTGTCTAATTTGCACGAAATTGCTTCTGGTGGCGC  
GCCTCTATCAAAGAAGTTGGAGAAGCGGTTCGCAAAA  
CGCTTTCATCTTCCAGGTATACGACAAGGATATGGGCT  
CACCGAACTACATCGGCTATACTCATTACACCGAAT  
05- GGAGATGATAAGCCAGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTT  
CATTTTTTTCTGCAAAAGTGGTGGACCTTGACACTGGG  
AAAACGCTTGGCTGTAATCAAAGGGGTGAATTATGTG  
TCAGAGGGCCTATGCTTATGCACAGCTACGTAAACAA  
CCCGGAGGCGACAAGTGCTTTAATTGACAAGGATGGA  
10- TGGTTACATTCTGGTGACATATCGTACTGGGATGAAG  
ACGGCCACTTTTTTCATAGTTGATCGTTTGAAGTCTTTA  
ATTAAATACAAAGGCTATCAGGTACCCCCCGCCGAAT  
TGGAATCGATACTGCTACAGCACCCCTGCATATTTGAT  
GCGGGCGTGGCAGGCATTCCTGACGAAGATGCCGGAG  
15- AACTTCCAGCCGCCGTGGTTGTTTTGGAGCAAGGAAA  
AACATTGACGGAAAAAGAAATCATGGATTACGTGGCA  
GGTATGGTGACAACAGCGAAACGGTTGCGCGTATTTG  
TCGACGAAGTACCTAAAGGTCTAACCGGAAAACCTCGA  
CGCAAGAAAAATCAGGGAGATCCTCGTGAAGGCCAA  
20- GATAGGCGGAAAGTCCAAATTATAAACTCTTGCTGTT  
TCGAACGCTGACGAAATTTTTAGCTATTGTAATATTAT  
ATGCAAATTGATGAATGGTAGAGGAAGCATTTAGGGA  
ATTCATTATCGATATAGTTTTCAATTTTTTCGGAGGAGT  
TCATTGCACTGAACATTGGTAATTTTGTAATTGAGGGT  
25- CACTGTGCTGTAATTTTCATTATGAGTGTTCTAACGAA  
TAATAAAATTCAGGTATAGTTAAAAAGCGGCCCGCGAA

O invento apresenta a seqüência de aminoácidos da luciferase de *Macrolampis* sp2, conforme técnicas descritas a seguir.

30- MEDEKNIIHGPEPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGT  
IAFTDAHIEVNITYAEYFEMSCRLAEAMXRYGLGLKHRI

VVCSENSLQFFMPVLGALFIGVALAPANDIYNERELLNSM  
TISQPTIVFCSSKGLQKILNVQKKLPVIQKIVIMDSKPDYQ  
GFQSMYTFIESHLPQGFNEYDFVPDSFDRDATIALIMNSSG  
STGLPKGVALPHKNACVRFSHARDPIYGNQIIPDTAILS  
05- PFHHGFGMFTTLGYLICGFRVILMYRFEEELFLRCLQDYKI  
QSAILVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEV  
GEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPNGDDKPGAVG  
KVVPFFSAKVVDLDTGKTLGCNQRGELCVRGPMLMHSY  
VNNPEATSALIDKDGWLHSGDISYWDEDGHFFIVDRLKSL  
10- IKYKGYQVPPAELESILLQHPCIFDAGVAGIPDEDAGELPA  
AVVVLEQGKTLTEKEIMDYVAGMVTAKRLRGGVVFVD  
EVPKGLTGKLDARKIREILVKAKIGGKSKL

#### Descrição dos Desenhos

15- Os exemplos que se seguem ilustram a invenção em  
maiores detalhes.

A Fig. 1. mostra o efeito do pH e tampão fosfato no espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis*: (a) Tris-HCl 0.1 M pH 8; (b) fosfato 0.1M pH 8; (c) fosfato 0.1 M pH 7 e (d) fosfato 0.1 M pH 6.

20- A Figura 2 apresenta o efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência *in vitro*. (Painel direito) colônias de bactérias *E.coli* SOLR transformadas com o plasmídeo pBluescript SK-Macroluc expressando a luciferase de *Macrolampis* e bioluminescência de cromaticidade termosensitiva quando expostas a  
25- diferentes temperaturas após a indução por IPTG e borrifamento de luciferina (tampão citrato pH 5).

30- Por fim, a Figura 3, mostra a razão entre as  
intensidades de luminescência em 620 nm e 540 nm em função do pH em diferentes luciferases pH-sensitivas.

A comparação das estruturas primárias de



05- *Macrolampis* e *Photinus pyralis* associada a estudos de mutagênese sítio-dirigida revelou que a os resíduos N354, H310, E311 e Y227, constituem parte importante do sensor de pH e temperatura (Viviani et al., 2005 no prelo). Estes dados podem servir como base para a futura engenharia desta e outras luciferases para produzir mutantes com diferentes sensibilidades à mudanças de pH, fosfato e concentrações de cátions de metais divalentes pesados.

#### Características do invento.

10- A luciferase de *Macrolampis*, uma vez expressa sob condições apropriadas em células de bactérias, extraída e purificada, é cataliticamente ativa produzindo bioluminescência em presença de luciferina, ATP, magnésio e oxigênio. O espectro de bioluminescência da luciferase é naturalmente bimodal em pH 15- 8 e apresenta sensibilidade pronunciada ao pH e outras condições (Figura 3). A Fig. 4 mostra o efeito da temperatura no espectro de bioluminescência desta luciferase. Os máximos de emissão do espectro de bioluminescência desta luciferase e algumas propriedades são apresentados na Tabela 1.

20- Tabela 1.

Propriedades espectrais da luciferase de *Macrolampis* e seus mutantes.

Luciferase	$\lambda_{\max}$ (nm)	
	[Half-Bandwidth]	
	pH 8	pH 6
<i>Macrolampis</i>	569 [99]	606 [77]
C276S	569 [99]	606 [77]
N354E	558 [83]	606 [77]
30- H310A	564 [99]	607 [77]
H310R	573-579 [105]	607 [69]

E311A	600	611
<i>Photinus pyralis</i>	555 [74]	608 [62.5]
<i>Cratomorphus distinctus</i>	548 [71]	610 [95]

05- **Método de expressão de luciferases e detecção de bioluminescência *in vivo*.**

10- O plasmídeo pBluescript contendo o cDNA para a luciferase de *Macrolampis* foi utilizado para transformar as células *E.coli* X11-Blue (Stratagene), as quais foram cultivadas em meio LB contendo ampicilina a 37°C durante a noite e então induzidas a 25°C durante 6h em placas contendo meio LB/Amp complementado com IPTG (Isopropiltiogalactosídeo) 1 mM para a expressão de luciferase.

15- As colônias vivas expressando luciferases foram então borrifadas com luciferina 1 mM em tampão citrato pH 5.0 para indução de bioluminescência *in vivo*. A bioluminescência das colônias bacterianas induzidas pode ser detectada visualmente, luminometricamente, com câmaras de fotodeteção, e em filmes fotográficos.

20- As luciferases também podem ser expressas nas bactérias em culturas líquidas para posterior extração e purificação na forma ativa (produz bioluminescência na presença dos substratos MgATP, luciferina em meio aeróbico) conforme protocolos descritos (Viviani et al., 1999<sup>a,b,c</sup>). Os espectros de bioluminescência foram registrados em espectrofluorímetro Spex Fluoromax conforme descrito (Viviani et al., 1999a).

25- **Análise qualitativa de mudanças físico-químicas intracelulares em função dos espectros de bioluminescência usando as luciferases de *Macrolampis* e de outros lampirídeos.**

30- Até o momento as luciferases de lampirídeos tem

05- sido utilizadas unicamente para análises de intensidade de luminescência. A quantificação de dois eventos simultâneos regulados geneticamente, por exemplo, tem sido feita através da utilização de dois genes repórter de luciferases que emitem em diferentes comprimentos de onda associados a diferentes promotores (Wood; Nakajima et al., 2004).

10- Notavelmente, embora a sensibilidade ao pH e outros fatores nas luciferases de lampirídeos seja conhecida a um bom tempo (Seliger, 1964), até o momento não se utilizou esta propriedade dinâmica para finalidades analíticas.

15- Existe uma relação quantificável entre a razão das intensidades de bioluminescência em 620 nm e 540 nm em função do pH (Fig. 5) e de outras variantes físico-químicas como a concentração de certos cátions de metais divalentes (mercúrio, zinco, cobre) . Esta razão depende da luciferase (Viviani et al., 2005 no prelo) e ela é mais alta quanto mais sensível for a luciferase, como no caso da luciferase do *Macrolampis* sp2.

20- Assim sendo, utilizando equipamentos de fotodeteção altamente sensíveis com filtros de corte, como o luminômetro recentemente desenvolvido pela empresa ATTO (Tóquio, Japão; <http://www.atto.co.jp/englishtop.html>) para detecção simultânea da bioluminescência verde e vermelha das luciferases do *Phrixotrix* em células vivas, pretendemos introduzir a luciferase do *Macrolampis* como o primeiro gene repórter dual para análises simultâneas de intensidade de luminescência (como mas não limitada à expressão gênica, quantificação de ATP) e variação espectral (em 620 e 540 nm) em função do pH e outras mudanças homeostáticas intracelulares para finalidades bioanalíticas.

30- A patente incorpora características inovatórias, por estas vantagens reúne as condições necessárias para alcançar o privilégio pleiteado.

### REIVINDICAÇÕES

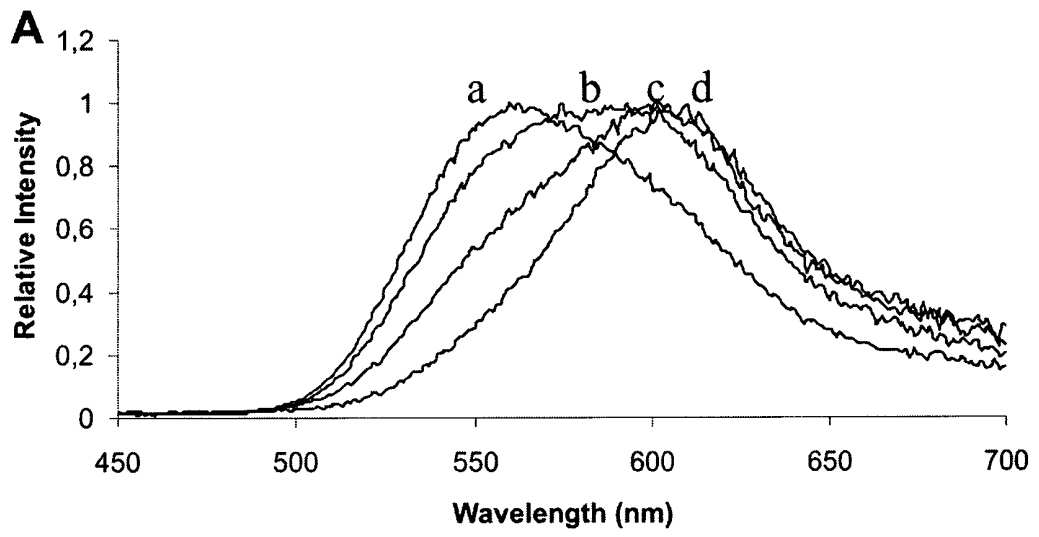
1. Luciferase de *Microlampis* SP, caracterizado por seqüência de cDNA codificadora da Luciferase de *Macrolampis* sp2.
- 05- 2. Luciferase de *Microlampis* SP, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por gene repórter dual que codifica uma proteína bioluminosa para uso em biosensores simultâneos de expressão gênica e variações de intracelulares de PH, com concentrações de Fosfato e Cátions divalentes de metais pesados.
- 10- 3. O gene da luciferase do *Macrolampis* sp, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por gene repórter para estudos de expressão gênica em células e tecidos.
- 15- 4. A Luciferase de *Macrolampis* SP, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por seu uso para fins bioanalíticos de detecção e quantificação de ATP e contaminação microbiológica de amostras várias, através da medida luminométrica ou fotográfica da bioluminescência.
- 20- 5. A seqüência de aminoácidos da Luciferase de *Macrolampis* sp2 especificada e codificada pela seqüência de cDNA, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por seqüências de aminoácidos com identidade igual ou maior que 95% que contenham as substituições Y227 e N354.
- 25- 6. Luciferase de *Microlampis* SP, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por ser cataliticamente ativa produtora de bioluminescência amarela com espectro de bioluminescência bimodal especificado na Fig. 1 e com as propriedades citadas nas Figuras 1 e 2.
- 30- 7. Luciferase de *Microlampis* SP, de acordo com as reivindicações 1 e 3, é caracterizado por um método de expressão e detecção *in vivo* da luciferase de *Macrolampis* que

possibilita ser expressa em sua forma cataliticamente ativa e produtora de bioluminescência em células de bactérias, leveduras, plantas, insetos, mamíferos, mas não limitadas a estas últimas.

- 05- 8. O gene repórter dual baseado na luciferase de *Macrolampis sp2* e outras luciferases de lampirídeos pH-sensitivas, é caracterizado pela análise simultânea da expressão gênica através da quantificação fotométrica/fotográfica/Luminométrica da bioluminescência e das variações intracelulares/extracelulares de mudanças de pH, fosfato e concentração de metais pesados divalentes ( $Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ) em função da razão de intensidades de luminescência em 620 e 540 nm.. Um protótipo é o sistema *E.coli* SOLR/ plasmídeo pBluescript SK-Macroluc.
- 10- 9. Luciferase de *Microlampis SP*, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por um mutante produtor de luz vermelha consistindo da seqüência de aminoácidos da luciferase de *Macrolampis* especificada e codificada pela seqüência de cDNA especificada no item 1, contendo a substituição E311A.
- 15- 10. Luciferase de *Macrolampis SP* Luciferase de *Microlampis SP*, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por ser única em sua seqüência de DNA e de aminoácidos apresenta propriedades espectrais diferenciais que a tornam potencialmente útil como gene repórter em biosensores para mudanças físico-químicas intracelulares como mudanças de pH e outras condições homeostáticas, concentração de fosfato e metais pesados, utilizando o parâmetro espectral além do parâmetro de intensidade.
- 20- 25-

-01/03-

FIGURA 01



-02/03-

FIGURA 02

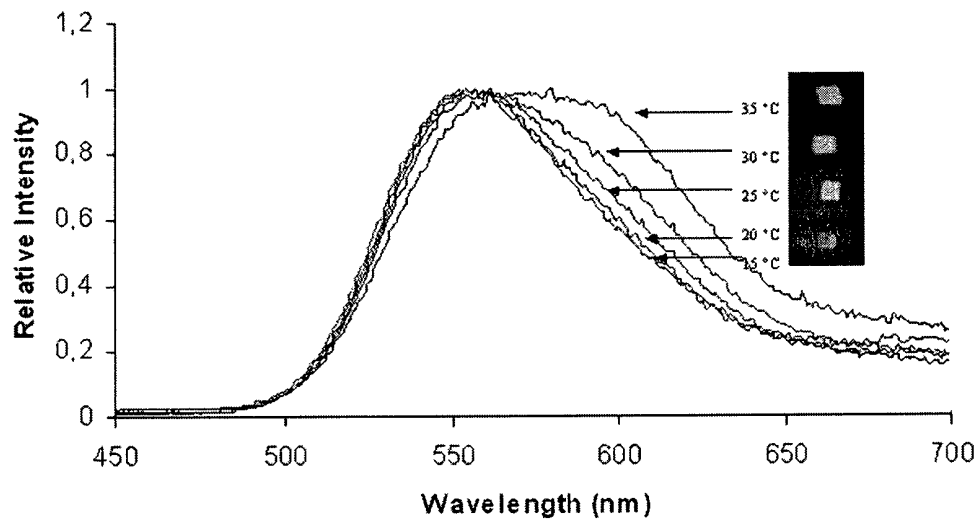
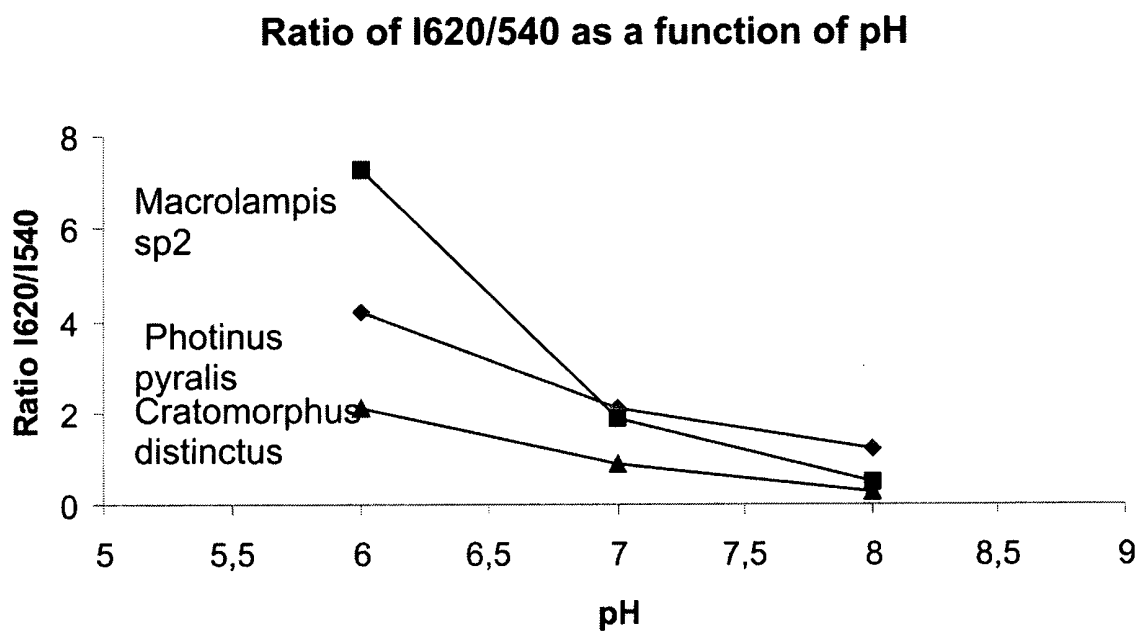


FIGURA 03





## RESUMO

05- **Patente de Invenção “LUCIFERASE DE *MACROLAMPIS* SP COMO GENE REPÓRTER DUAL EM BIOSENSORES SIMULTÂNEOS DE EXPRESSÃO GÊNICA E VARIACÕES DE INTRACELULARES DE PH, CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO E CÁTIONS DIVALENTES DE METAIS PESADOS”.**

10- Trata-se a presente invenção de um produto da área de biotecnologia constituído de Luciferase de *Microlampis* SP recombinate apresenta espectro de bioluminescência bimodal e sensibilidade elevada a mudanças de pH- e temperatura, como gene repórter dual que codifica uma proteína bioluminosa para uso em biosensores simultâneos de expressão gênica e variações de intracelulares de PH, com concentrações de Fosfato e Cátions

15- divalentes de metais pesados, e presença de ATP e como biosensor intracelular de mudanças de pH e outras condições homeostáticas.