

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 252**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11730562 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2582807**

54 Título: **ADN polimerasas con diferenciación de desapareamientos 3' aumentada**

30 Prioridad:

18.06.2010 US 356292 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.05.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**REICHERT, FRED;
BAUER, KEITH y
MYERS, THOMAS W.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 252 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

ADN polimerasas con diferenciación de desapareamientos 3' aumentada

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona ADN polimerasas con diferenciación de desapareamientos 3' aumentada y su uso en diversas aplicaciones, incluyendo extensión y amplificación de polinucleótidos de ácidos nucleicos.

10 Antecedentes de la invención

Las ADN polimerasas son responsables de la replicación y el mantenimiento del genoma, un papel que es central para la transmisión precisa de la información genética de generación en generación. Las ADN polimerasas actúan en células como las enzimas responsables de la síntesis de ADN. Polimerizan desoxirribonucleósido trifosfatos en presencia de un activador metálico, tal como Mg^{2+} , en un orden dictado por el molde de ADN o molde polinucleotídico que se copia. *In vivo*, las ADN polimerasas participan en un espectro de procesos sintéticos de ADN incluyendo replicación de ADN, reparación de ADN, recombinación y amplificación génica. Durante cada proceso sintético de ADN, el molde de ADN se copia una vez o como máximo varias veces para producir réplicas idénticas. Por el contrario, *in vitro*, la replicación de ADN puede repetirse muchas veces tal como, por ejemplo, durante la reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.683.202).

Los estudios iniciales con reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la ADN polimerasa se añadió al comienzo de cada ciclo de replicación de ADN (véase Patente de Estados Unidos N° 4.683.202, mencionado anteriormente). Posteriormente, se determinó que podrían obtenerse ADN polimerasas termoestables a partir de bacterias que crecen a temperaturas elevadas, y que es necesario añadir estas enzimas solamente una vez (véase Patente de Estados Unidos N° 4.889.818 y Patente de Estados Unidos N° 4.965.188). A las temperaturas elevadas usadas durante la PCR, estas enzimas no se inactivan de forma irreversible. Como resultado, se pueden llevar a cabo ciclos repetitivos de reacciones en cadena de la polimerasa sin añadir nuevas enzimas al comienzo de cada proceso de adición sintético. Las ADN polimerasas, particularmente polimerasas termoestables, son la clave de un gran número de técnicas en estudios de ADN recombinantes y en diagnóstico médico de la enfermedad. Para aplicaciones de diagnóstico en particular, una secuencia de ácido nucleico diana puede ser solamente una pequeña parte del ADN o ARN en cuestión, de modo que puede ser difícil detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana sin amplificación.

El patrón de plegamiento general de las ADN polimerasas se asemeja a la mano derecha humana y contiene tres subdominios distintos de palma, dedos y pulgar (véase Beese *et al.*, Science 260: 352-355, 1993; Patel *et al.*, Biochemistry 34:5351-5363, 1995). Aunque la estructura de los subdominios de dedos y pulgar varían en gran medida entre las polimerasas que difieren en tamaño y en funciones celulares, los subdominios de palma catalíticos son todos superponibles. Por ejemplo, al motivo A, que interacciona con el de dNTP entrante y estabiliza el estado de transición durante la catálisis química, puede superponerse con una desviación media de aproximadamente un A entre las ADN polimerasas de la familia pol α de mamífero y pol I procarionta (Wang *et al.*, Cell 89: 1087-1099, 1997). El motivo A comienza estructuralmente en una cadena β antiparalela que contienen restos predominantemente hidrófobos y continúa hasta una hélice α . La secuencia de aminoácidos primaria de sitios activos de ADN polimerasa está excepcionalmente conservada. En el caso del motivo A, por ejemplo, la secuencia DYSQIELR (SEC ID N°: 28) se conserva en polimerasas de organismos separados por muchos millones de años de evolución, incluyendo, por ejemplo, *Thermus aquaticus*, *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli*.

Además de estar bien conservado, se ha mostrado que el sitio activo de ADN polimerasas es relativamente mutable, capaz de acomodar ciertas sustituciones de aminoácidos sin reducir la actividad ADN polimerasa significativamente (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.602.695). El documento WO 2008/046612 desvela ADN polimerasas ZO5 que comprenden una mutación del resto de aminoácido D al resto de aminoácido G en la posición 580 que tienen tasas de extensión mejoradas en relación con una polimerasa no modificada, correspondiente. Dichas ADN polimerasas mutantes pueden ofrecer diversas ventajas selectivas, por ejemplo, en las aplicaciones de diagnóstico e investigación que comprenden reacciones de síntesis de ácido nucleico. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de identificar posiciones de aminoácidos susceptibles de mutación para producir actividades polimerasa mejoradas. La presente invención, como se expone en el presente documento, cumple estas y otras necesidades.

60 Breve resumen de la invención

Se proporcionan en el presente documento ADN polimerasas que tienen diferenciación de desapareamientos 3' aumentada en relación con una polimerasa de control no modificada, correspondiente, y métodos para preparar y usar dichas ADN polimerasas. En algunas realizaciones, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoactiva. Una ADN polimerasa de acuerdo con la invención tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 1 y tiene actividad de diferenciación

de desapareamiento 3' aumentada en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que la ADN polimerasa comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X₁₃-D-E-L, en la que:

5 X₁₃ es A, G, S, T, Y, D, o K (SEC ID N°: 11), y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto que el aminoácido X₁₃ de la ADN polimerasa de control es F. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa deriva de una especie de *Thermus*. También se desvela que la ADN polimerasa deriva de una especie de *Thermotoga*.

10 Como se describe en el presente documento, de acuerdo con la invención el aminoácido de una ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 puede mutarse del aminoácido nativo en esa posición para producir una enzima que tenga diferenciación de desapareamientos 3' aumentada en relación con una polimerasa de control no modificada, correspondiente. En ADN polimerasas derivadas de una especie de *Thermus*, el aminoácido nativo correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es F. En ADN polimerasas derivadas de una especie de *Thermotoga*, el aminoácido nativo correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es F. En ADN polimerasas derivadas de otras especies no *Thermus*, no *Thermotoga*, el aminoácido correspondiente a la posición 15 497 de SEC ID N°: 1 puede ser F o un aminoácido distinto de F, por ejemplo, Y. Véase, Figura 1.

También se desvela que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de F o Y, y la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 20 497 de SEC ID N°: 1 es F o Y. Por ejemplo, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 se selecciona de G, A, V, L, I, M, W, P, S, T, C, N, Q, D, E, K, R o H. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 se selecciona de A, G, S, T, D o K. También se desvela que la ADN polimerasa de la invención deriva de una especie de *Thermus*, y el aminoácido de 25 la ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de F, y la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es F. Por ejemplo, cuando la ADN polimerasa deriva de una especie de *Thermus*, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 30 497 de SEC ID N°: 1 puede seleccionarse de G, A, V, L, I, M, W, P, S, T, C, N, Q, D, E, K, R, H o Y. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 se selecciona de A, G, S, T, Y, D o K. En algunas realizaciones el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 se selecciona de A, G, S, T, D o K.

35 También se desvela que la ADN polimerasa de la invención deriva de una especie de *Thermus*, y el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es un aminoácido que tiene una cadena lateral polar, sin carga (por ejemplo, N, Q, H, S, T o Y), una cadena lateral no polar, sin carga (distinta de F, por ejemplo, G, A, L, M, W, P, C, V o I), una cadena lateral polar, con carga positiva (por ejemplo, R o K), o cadena lateral polar, con carga negativa (por ejemplo, D o E) a pH neutro. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 40 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral polar, sin carga es S, T o Y. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral no polar, sin carga es A o G. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral polar, con carga positiva es K. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N° 1 que tiene una cadena lateral polar, con carga negativa es D.

45 También se desvela que la ADN polimerasa que tiene diferenciación de desapareamiento 3' aumentada comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende A-G-X₁-X₂-F-X₃-X₄-X₅-S-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L, en el que:

50 X₁ es H, E o Q;
X₂ es P, T o E;
X₃ es N o H;
X₄ es L o I;
X₅ es N o R;
55 X₇ es R, P, o S;
X₈ es D, K o T;
X₉ es L o V;
X₁₀ es E, S, A o G;
X₁₁ es R, N, Y, T o V;
60 X₁₂ es V o I;
X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de F o Y;
X₁₄ es D o E; y
X₁₅ es E o K (SEC ID N°: 8).

65 También se desvela que X₁₃ se selecciona de G, A, L, M, W, P, S, T, R, K, C, N, Q, D, E, V, I o H (SEC ID N°: 49).

También se desvela que la ADN polimerasa que tiene diferenciación de desapareamiento 3' aumentada comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende

A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-S-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L, en el que:

- 5 X₁ es H o E;
 X₄ es L o I;
 X₇ es R o P;
 X₈ es D o K;
 X₉ es L o V;
 10 X₁₀ es E o S;
 X₁₁ es R o N;
 X₁₂ es V o I;
 X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de F;
 X₁₄ es D o E; y
 15 X₁₅ es E o K (SEC ID N°: 9).

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa que tiene diferenciación de desapareamientos 3' aumentada comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X₁₃-D-E-L, en la que:

- 20 X₁₃ es A, G, S, T, Y, D o K (SEC ID N°: 11).

También se desvela que X₁₃ es un aminoácido que tiene una cadena lateral polar, sin carga (por ejemplo, N, Q, H, S, T o Y), una cadena lateral no polar, sin carga (y distinta de F, por ejemplo, G, A, L, M, W, P, C, V o I), una cadena lateral polar, con carga positiva (por ejemplo, R o K), o cadena lateral polar, con carga negativa (por ejemplo, D o E).

- 25

En algunas realizaciones, X₁₃ es A, G, S, T, D o K (SEC ID N°: 48).

También se desvela que la ADN polimerasa comprende además una mutación en uno o mas aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de 488 y/o 493 de SEC ID N°: 1. Por ejemplo, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de E, S, A o G. También se desvela que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 se selecciona de Q, R, V, L, I, M, F, W, P, T, C, N, D, Y, K o H. También se desvela que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 se selecciona de K o R. También se desvela que la ADN polimerasa de la invención deriva de una especie de *Thermus*, y el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de E. Por ejemplo, cuando la ADN polimerasa deriva de una especie de *Thermus*, la ADN polimerasa puede comprender además un aminoácido seleccionado de S, A, G, V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, K, R o H en la posición correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1. También se desvela que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 se selecciona de S, A, G, K o R. También se desvela que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 se selecciona de A, G, K o R. También se desvela que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de SEC ID N°: 1 es K.

- 30
- 35
- 40

También se desvela que la ADN polimerasa puede comprender además cualquier aminoácido distinto de S en la posición correspondiente a la posición 488 de SEC ID N°: 1. Por ejemplo, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 488 de SEC ID N°: 1 se selecciona de G, A, V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R o H. También se desvela que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 488 de SEC ID N°: 1 se selecciona de G, A, D, F, K, C, T o Y.

- 50

En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de D o E. En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de D. En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID N°: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID N°: 1 es G.

- 55

Diversas ADN polimerasas son susceptibles de mutación de acuerdo con la presente divulgación. Son particularmente adecuadas polimerasas termoestables, incluyendo de tipo silvestre o polimerasas termoestables de origen natural de diversas especies de bacterias termófilas, así como polimerasas termoestables sintéticas derivadas de dichas enzimas de tipo silvestre o de origen natural por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, u otra modificación. Las formas no modificadas ejemplares de la polimerasa incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa CS5 (SEC ID N°: 29), CS6 (SEC ID N°: 30) o Z05 (SEC ID N°: 1), o una ADN polimerasa funcional que tiene al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con las mismas. Otras polimerasas no modificadas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de cualquiera de las siguientes especies de bacterias termófilas (o una ADN polimerasa funcional que tiene al menos 80 %,

- 60
- 65

- preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con dicha polimerasa): *Thermotoga maritima* (SEC ID N°: 38); *Thermus aquaticus* (SEC ID N°: 2); *Thermus thermophilus* (SEC ID N°: 6); *Thermus flavus* (SEC ID N°: 4); *Thermus filiformis* (SEC ID N°: 3); *Thermus* sp. Sps17 (SEC ID N°: 5); *Thermus* sp. Z05 (SEC ID N°: 1); *Thermotoga neopolitana* (SEC ID N°: 39); *Thermosipho africanus* (SEC ID N°: 37);
- 5 *Thermus caldophilus* (SEC ID N°: 7), *Deinococcus radiodurans* (SEC ID N°: 36), *Bacillus stearothermophilus* (SEC ID N°: 40) o *Bacillus caldotenax* (SEC ID N°: 41). Las polimerasas adecuadas también incluyen las que tienen actividad transcriptasa inversa (RT) y/o la capacidad para incorporar nucleótidos poco convencionales, tales como ribonucleótidos u otros nucleótidos 2' modificados.
- 10 Aunque las ADN polimerasas termoestables que poseen actividad de diferenciación de desapareamiento 3' eficaz son particularmente adecuadas para realizar PCR, las ADN polimerasas termoactivas, pero no termoestables, que poseen actividad de diferenciación de desapareamientos 3' eficaz también son susceptibles de mutación de acuerdo con la presente divulgación.
- 15 En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de *Thermus*. También se desvela que la ADN polimerasa tiene al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con una polimerasa seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 (a) una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05) (SEC ID N°: 1);
 (b) una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID N°: 2);
 (c) una ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi) (SEC ID N°: 3);
 (d) una ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl) (SEC ID N°: 4);
 (e) una ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17) (SEC ID N°: 5);
 (f) una ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID N°: 6); y
 25 (g) una ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca) (SEC ID N°: 7).

- También se desvela que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de *Thermotoga*. Por ejemplo, la ADN polimerasa tiene al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con una polimerasa seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 (a) una ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID N°: 38);
 (b) una ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEC ID N°: 39).

- En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa tiene al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05) (es decir, SEC ID N°: 1), excepto que el aminoácido en la posición 497 es cualquier aminoácido distinto de F. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 497 se selecciona de G, A, V, L, I, M, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R o H. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 497 es A, G, S, T, Y, D o K. En algunas realizaciones, la
- 40 ADN polimerasa deriva de otra especie no *Thermus*, no *Thermotoga*, y el aminoácido en la posición 497 es cualquier aminoácido distinto de F o Y, por ejemplo, A, G, S, T, D o K. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 que comprende además una sustitución en la posición 580, y el aminoácido en la posición 580 es cualquier aminoácido distinto de D o E. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 es cualquier aminoácido distinto de D. En algunas realizaciones, la ADN
- 45 polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 es G.

- La polimerasa mutante o mejorada puede incluir otras modificaciones no de sustitución. Una de dichas modificaciones es una modificación covalente térmicamente reversible que inactiva la enzima, pero que se invierte para activar la enzima tras su incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura típicamente usada para extensión de polinucleótidos. Se describen reactivos ejemplares para dichas modificaciones térmicamente reversibles en las Patentes de Estados Unidos N° 5.773.258 y 5.677.152 de *Birch et al.*
- 50

- 55 En algunas realizaciones, la actividad de desapareamiento 3' se determina usando un polinucleótido diana BRAF V600R mutante que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 35 (BRAF de tipo silvestre = SEC ID N°: 34) en presencia de un cebador directo que coincide perfectamente con la secuencia mutante y tiene un único desapareamiento 3' A:C con la secuencia de tipo silvestre en una o más mezclas de reacción que tienen un número de copias predeterminado del polinucleótido diana BRAF V600 de tipo silvestre y un número de copias predeterminado del polinucleótido diana BRAF V600R mutante igual en número o menor que el número de copias de la diana de tipo silvestre (por ejemplo, 10.000 o menos copias). Dos o más mezclas de reacción pueden tener números de copias valoradas de polinucleótido diana BRAF V600R mutante (por ejemplo, valoraciones 1:5, valoraciones 1:10, por ejemplo, 10.000 copias, 1000 copias, 100 copias, 10 copias, 1 copia, 0 copias en varias mezclas de reacción). La capacidad de diferenciación de desapareamientos 3' de una polimerasa de la invención puede compararse con la capacidad de diferenciación de desapareamientos 3' de una polimerasa de referencia (por ejemplo, una polimerasa de origen natural o no modificada), durante una unidad de tiempo preseleccionada, como
- 60
- 65

se describe en el presente documento. Las polimerasas con capacidad de diferenciación de desapareamientos 3' aumentada no amplificarán la secuencia de tipo silvestre cuando se pone en contacto con un cebador que coincide perfectamente con un alelo mutante, o requerirá un mayor número de ciclos de PCR para amplificar la secuencia de tipo silvestre usando el cebador específico de alelo mutante (es decir, muestran un mayor valor C_p), en comparación con una polimerasa de origen natural o no modificada.

En diversos otros aspectos, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica una ADN polimerasa mutante o mejorada como se describe en el presente documento, un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y/o una célula hospedadora transformada con el vector. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión. Las células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión son útiles en los métodos de la invención para producir la polimerasa mutante o mejorada cultivando las células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante. Las polimerasas de la invención pueden estar contenidas en mezclas de reacción y/o kits. Las realizaciones de los ácidos nucleicos recombinantes, células hospedadoras, vectores, vectores de expresión, mezclas de reacción y kits son como se ha descrito anteriormente y en el presente documento.

En otro aspecto más, se proporciona un método para realizar extensión de polinucleótidos. El método generalmente incluye poner en contacto una ADN polimerasa que tiene diferenciación de desapareamientos 3' aumentada como se describe en el presente documento con un cebador, un molde polinucleotídico y nucleósido trifosfatos en condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido. El molde polinucleotídico puede ser, por ejemplo, un molde de ARN o ADN. Los nucleósido trifosfatos pueden incluir nucleótidos no convencionales tales como, por ejemplo, ribonucleótidos y/o nucleótidos marcados. Además, el cebador y/o molde puede incluir uno o más análogos de nucleótidos. En algunas variaciones, el método de extensión de polinucleótidos es un método para la amplificación de polinucleótidos que incluye poner en contacto la ADN polimerasa mutante o mejorada con un par de cebadores, el molde polinucleotídico y los nucleósido trifosfatos en condiciones adecuadas para la amplificación del polinucleótido. La reacción de extensión del polinucleótido puede ser, por ejemplo, PCR, extensión isotérmica o secuenciación (por ejemplo, reacción de secuenciación 454).

En algunas realizaciones, el método de extensión de cebadores es un método para realizar reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención también proporciona un kit útil en dicho método de extensión de polinucleótidos. En general, el kit incluye al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa mutante o mejorada como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el kit incluye además uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, en variaciones específicas, el o los recipientes adicionales proporcionan nucleósido trifosfatos; un tampón adecuado para extensión de polinucleótidos; y/o un cebador hibridable, en condiciones de extensión de polinucleótidos, con un molde polinucleotídico predeterminado.

Se proporcionan además mezclas de reacción que comprenden las polimerasas de la invención. Las mezclas de reacción también pueden contener un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos de cebadores o sondas, nucleósido trifosfatos (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos marcados, nucleótidos poco convencionales), tampones, sales, marcadores (por ejemplo, fluoróforos).

Se describen en el presente documento realizaciones adicionales de la invención.

DEFINICIONES

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse esencialmente cualquier método y material similares a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, solamente se describen métodos y materiales ejemplares. Para fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Los términos "un" y "el" incluyen referentes plurales, a no ser que el contexto claramente indique otra cosa.

Un "aminoácido" se refiere a cualquier unidad monomérica que puede incorporarse en un péptido, polipéptido o proteína. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" incluye los siguientes veinte aminoácidos alfa codificados genéticamente o naturales: alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), glutamina (Gln o Q), ácido glutámico (Glu o E), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V). En casos en los que los restos "X" no estén definidos, estos se deberían definir como "cualquier aminoácido". Las estructuras de estos veinte aminoácidos naturales se muestran, por ejemplo, en Stryer *et al.*, *Biochemistry*, 5^a ed., Freeman and Company (2002). También pueden codificarse genéticamente aminoácidos adicionales, tales como selenocisteína y pirrolisina (Stadtman (1996) "Selenocysteine," *Annu Rev Biochem.* 65: 83-100 y Ibba *et al.* (2002) "Genetic code: introducing pyrrolysine," *Curr Biol.* 12(13): R464-R466). El término "aminoácido" también incluye aminoácidos no

naturales, aminoácidos modificados (por ejemplo, que tienen cadenas laterales y/o cadenas principales modificadas), y análogos de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Zhang *et al.* (2004) "Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(24): 8882-8887, Anderson *et al.* (2004) "An expanded genetic code with a functional quadruplet codon" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(20): 7566-7571, Ikeda *et al.* (2003) "Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo," Protein Eng. Des. Sel. 16(9): 699-706, Chin *et al.* (2003) "An Expanded Eukaryotic Genetic Code", Science 301(5635): 964-967, James *et al.* (2001) "Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues", Protein Eng. Des. Sel. 14(12): 983-991, Kohrer *et al.* (2001) "Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(25): 14310-14315, Bacher *et al.* (2001) "Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue", J. Bacteriol. 183(18): 5414-5425, Hamano-Takaku *et al.* (2000) "A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine", J. Biol. Chem. 275(51): 40324-40328, y Budisa *et al.* (2001) "Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids", Protein Sci. 10(7): 1281-1292.

Para ilustrar adicionalmente, un aminoácido es típicamente un ácido orgánico que incluye un grupo amino sustituido o no sustituido, un grupo carboxi sustituido o no sustituido, y una o más cadenas o grupos laterales, o análogos de cualquiera de estos grupos. Las cadenas laterales ejemplares incluyen, por ejemplo, tiol, seleno, sulfonilo, alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidracina, ciano, halo, hidracida, alquenilo, alquinilo, éter, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina o cualquier combinación de estos grupos. Otros aminoácidos representativos incluyen, pero sin limitación, aminoácidos que comprenden agentes de reticulación fotoactivables, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos con marcaje de espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos con grupos funcionales nuevos, aminoácidos que interaccionan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotomarcados y/o fotoisomerizables, aminoácidos radiactivos, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, otros aminoácidos con carbohidratos modificados, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos que contienen azúcares con enlaces de carbono, aminoácidos redox activos, aminoácidos que contienen amino tioácido y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

El término "aptámero" se refiere a un ADN monocatenario que reconoce y se une con ADN polimerasa, e inhibe eficazmente la actividad polimerasa como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.693.502.

El término "mutante", en el contexto de ADN polimerasas de la presente invención, significa un polipéptido, típicamente recombinante, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en relación con una ADN polimerasa correspondiente, de origen natural o no modificada.

La expresión "forma no modificada", en el contexto de una polimerasa mutante, es una expresión usada en el presente documento para el fin de definir una ADN polimerasa mutante de la presente invención: la expresión "forma no modificada" se refiere a una ADN polimerasa funcional que tiene la secuencia de aminoácidos de la polimerasa mutante excepto en una o más posiciones de aminoácidos especificadas como características de la polimerasa mutante. Por lo tanto, la referencia a una ADN polimerasa mutante con respecto a (a) su forma no modificada y (b) una o más sustituciones de aminoácidos específicas significa que, con la excepción de la sustitución o las sustituciones de aminoácidos específicas, la polimerasa mutante tiene de otro modo una secuencia de aminoácidos idéntica a la forma no modificada en el motivo específico. La "polimerasa no modificada" (y por lo tanto también la forma modificada que tiene diferenciación de desapareamientos 3' aumentada) puede contener mutaciones adicionales para proporcionar funcionalidad deseada, por ejemplo, incorporación mejorada de didesoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, análogos de ribonucleótidos, nucleótidos marcados con colorante, modulación de la actividad 5' nucleasa, modulación de la actividad 3' nucleasa (o corrección), o similares. En consecuencia, al llevar a cabo la presente invención como se describe en el presente documento, se predetermina la forma no modificada de una ADN polimerasa. La forma no modificada de una ADN polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa de origen natural y/o de tipo silvestre, o una ADN polimerasa que ya se ha modificado intencionadamente. Una forma no modificada de la polimerasa es preferentemente una ADN polimerasa termoestable, tal como ADN polimerasas de diversas bacterias termófilas, así como variantes funcionales de las mismas que tienen identidad de secuencia sustancial con una polimerasa termoestable de origen natural o de tipo silvestre. Dichas variantes pueden incluir, por ejemplo, ADN polimerasas quiméricas tales como, por ejemplo, las ADN polimerasas quiméricas descritas en la Patente de Estados Unidos N° 6.228.628 y Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 2004/0005599. En ciertas realizaciones, la forma no modificada de una polimerasa tiene actividad transcriptasa inversa (RT).

La expresión "polimerasa termoestable", se refiere a una enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de polinucleótidos posteriores y no se desnaturaliza (se inactiva) irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalización de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y se ejemplifican, por ejemplo,

en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.202, 4.683.195 y 4.965.188. Como se usa en el presente documento una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en una reacción de ciclación de temperatura tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La desnaturalización irreversible para fines del presente documento se refiere a pérdida permanente y completa de la actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de la manera apropiada para formar productos de extensión polinucleotídicos que son complementarios de una cadena de ácido nucleico molde. Las ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, especie de *Thermus Sps17*, especie de *Thermus Z05*, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosiphon africanus*.

El término "termoactivo" se refiere a una enzima que mantiene propiedades catalíticas a temperaturas habitualmente usadas para transcripción inversa o etapas de hibridación/extensión en reacciones de RT-PCR y/o PCR (es decir, 45-80 °C). Son enzimas termoestables las que no se inactivan o se desnaturalizan de forma irreversible cuando se someten a temperaturas elevadas necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos. Las enzimas termoactivas pueden ser o no termoestables. Las ADN polimerasas termoactivas pueden ser ADN o ARN dependiente de especie termófila o de especie mesófila incluyendo, pero sin limitación, *Escherichia coli*, virus de la leucemia murina de Moloney y virus de la mioblastosis Aviar.

Como se usa en el presente documento, una proteína "quimérica" se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos representa un producto de fusión de subsecuencias de las secuencias de aminoácidos de al menos dos proteínas distintas. Una proteína quimérica típicamente no se produce por manipulación directa de secuencias de aminoácidos, sino que, más bien, se expresa a partir de un gen "quimérico" que codifica la secuencia de aminoácidos quimérica. En ciertas realizaciones, por ejemplo, una forma no modificada de una ADN polimerasa mutante de la presente invención es un proteína quimérica que consiste en una región amino terminal (N-terminal) derivada de una ADN polimerasa de especie de *Thermus* y una región carboxilo terminal (C terminal) derivada de ADN polimerasa Tma. La región N terminal se refiere a una región que se extiende desde el extremo N terminal (posición de aminoácido 1) a un aminoácido interno. De forma similar, la región C terminal se refiere a una región que se extiende desde un aminoácido interno al extremo C terminal.

En el contexto de las ADN polimerasas, la "correspondencia" con otra secuencia (por ejemplo, regiones, fragmentos, posiciones de nucleótidos o aminoácidos, o similares) se basa en la convención de numeración de acuerdo con el número de posición de nucleótido o aminoácido y alineando después las secuencias de manera que se maximice el porcentaje de identidad de secuencia. Debido a que no todas las posiciones dentro de una "región correspondiente" dada tienen que ser idénticas, las posiciones no coincidentes dentro de una región correspondiente pueden considerarse "posiciones correspondientes". En consecuencia, como se usa en el presente documento, la referencia a una "posición de aminoácido correspondiente a una posición de aminoácido [X]" de una ADN polimerasa específica se refiere a posiciones equivalentes, basándose en el alineamiento, en otras ADN polimerasas y homólogos estructurales y familias. En algunas realizaciones de la presente invención, la "correspondencia" de posiciones de aminoácidos se determina con respecto a una región de la polimerasa que comprende uno o más motivos de SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41. Cuando una secuencia polipeptídica de polimerasa difiere de SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41 (por ejemplo, por cambios en aminoácidos o adición o delección de aminoácidos), puede ser que una mutación particular asociada con actividad mejorada como se analiza en el presente documento no esté en el mismo número de posición que en la SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41. Esto se ilustra, por ejemplo, en la Tabla 1.

"Recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos o a una secuencia de nucleótidos que se ha modificado intencionadamente por métodos recombinantes. Por la expresión "ácido nucleico recombinante" en el presente documento se entiende un ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, por la manipulación de un ácido nucleico por endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por lo tanto un ácido nucleico de ADN polimerasa mutante, aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que no se unen normalmente, se consideran ambos recombinantes para los fines de la presente invención. Se entiende que una vez que se realiza un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula hospedadora, se replicará de forma no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedadora en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque se replican posteriormente de forma no recombinante, aún se consideran recombinantes para los fines de la invención. Una "proteína recombinante" es una proteína realizada usando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se ha representado anteriormente.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente con una secuencia codificante si se sitúa de modo que facilite la traducción.

La expresión “célula hospedadora” se refiere a organismos tanto procariotas unicelulares como eucariotas (por ejemplo, bacterias, levadura y actinomicetos) y células individuales de plantas o animales de órdenes superiores cuando se dejan crecer en cultivo celular.

5 El término “vector” se refiere a un trozo de ADN, típicamente bicatenario, que puede tener insertado un trozo de ADN ajeno. El vector puede ser, por ejemplo, de origen plasmídico. Los vectores contienen secuencias polinucleotídicas de “replicón” que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula hospedadora. El ADN ajeno se define como ADN heterólogo, que es ADN que no se encuentra de forma natural en la célula hospedadora, que, por ejemplo, replica el módulo de vector, codifica un marcador seleccionable o explorable, o codifica un transgén. El vector se usa para transportar el ADN ajeno o heterólogo a una célula hospedadora adecuada. Una vez que está en la célula hospedadora, el vector puede replicarse de forma independiente de o coincidente con el ADN cromosómico del hospedador, y pueden generarse varias copias del vector y su ADN insertado. Además, el vector también puede contener los elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado en una molécula de ARNm o provocar de otro modo la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión contienen adicionalmente elementos de secuencia adyacentes al ADN insertado que aumentan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula proteica. Muchas moléculas de ARNm y polipéptido codificado por el ADN insertado pueden por lo tanto sintetizarse rápidamente.

20 Se entenderá en el presente documento que el término “nucleótido”, además de hacer referencia a los monómeros ribonucleotídicos o desoxirribonucleotídicos de origen natural, hace referencia a variantes estructurales relacionadas del mismo, incluyendo derivados y análogos, que son funcionalmente equivalentes con respecto al contexto particular en el que se usa el nucleótido (por ejemplo, hibridación con una base complementaria), a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

25 La expresión “ácido nucleico” o “polinucleótido” se refiere a un polímero que puede corresponderse con un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo del mismo. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo, modificadas química o bioquímicamente) de los mismos, y polímeros mixtos (por ejemplo, incluyendo subunidades tanto de ARN como de ADN). Las modificaciones ejemplares incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno y similares), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse con una secuencia designada mediante enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros nucleotídicos se unen mediante enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describen en Nielsen *et al.* (Science 254: 1497-1500, 1991)). Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desnudo, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario, bicatenario o tricatenario, y no se limita a ninguna longitud particular. A no ser que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada de forma explícita.

45 El término “oligonucleótido” se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos). Un oligonucleótido típicamente incluye de aproximadamente seis a aproximadamente 175 unidades monoméricas de ácido nucleico, más típicamente de aproximadamente ocho a aproximadamente 100 unidades monoméricas de ácido nucleico, y aún más típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o más unidades monoméricas de ácido nucleico). El tamaño exacto de un oligonucleótido dependerá de muchos factores, incluyendo la función última o uso del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente por cualquier método adecuado, incluyendo, pero sin limitación, el aislamiento de una secuencia existente o natural, replicación o amplificación de ADN, transcripción inversa, clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa por un método tal como el método de fosfotriéster de Narang *et al.* (Meth. Enzymol. 68: 90-99, 1979); el método de fosfodiéster de Brown *et al.* (Meth. Enzymol. 68: 109-151, 1979); el método de dietil fosforamidita de Beaucage *et al.* (Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862, 1981); el método de triéster de Matteucci *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191, 1981); métodos de síntesis automática; o el método de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos N° 4.458.066, u otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

60 El término “cebador” como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico dirigida por molde cuando se sitúa en condiciones en las que se inicia la extensión de polinucleótidos (por ejemplo, en condiciones que comprenden la presencia de nucleósido trifosfatos requeridos (como se dicta por el molde que se copia) y una polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura o ciclo o ciclos de temperaturas adecuados (por ejemplo, como en una reacción en cadena de la polimerasa)). Para ilustrar adicionalmente, los cebadores también pueden usarse en una diversidad de otros procesos de síntesis

mediados por oligonucleótidos, incluyendo como iniciadores de la síntesis de ARN *de novo* y procesos relacionados con la transcripción *in vitro* (por ejemplo, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), etc.). Un cebador es típicamente un oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, oligodesoxirribonucleótido). La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador pero típicamente varía de 6 a 40 nucleótidos, más típicamente de 15 a 35 nucleótidos. Las moléculas de cebadores cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. No es necesario que un cebador refleje la secuencia exacta del molde pero debe ser suficientemente complementaria para hibridar con un molde para que se produzca la elongación del cebador. En ciertas realizaciones, la expresión “para el cebador” significa un conjunto de cebadores incluyendo un cebador con sentido 5’ (denominado en ocasiones “directo”) que hibrida con el complemento del extremo 5’ de la secuencia de ácido nucleico para amplificar y un cebador antisentido 3’ (denominado en ocasiones “inverso”) que hibrida con el extremo 3’ de la secuencia para amplificar (por ejemplo, si la secuencia diana se expresa como ARN o es un ARN). Un cebador puede marcarse, si se desea, incorporando un marcador detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos electrón densos, enzimas (como se usan habitualmente en ensayos de ELISA, biotina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales).

La expresión “sonda de nucleasa 5’” se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un resto marcador emisor de luz y que se usa en una reacción de nucleasa 5’ para efectuar detección de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, por ejemplo, una sonda de nucleasa 5’ incluye solamente un único resto emisor de luz (por ejemplo, un colorante fluorescente, etc.). En ciertas realizaciones, las sondas de nucleasa 5’ incluyen regiones de autocomplementariedad de modo que las sondas sean capaces de formar estructuras en horquilla en condiciones seleccionadas. Para ilustrar adicionalmente, en algunas realizaciones una sonda de nucleasa 5’ comprende al menos dos restos marcadores y emite radiación de mayor intensidad después de escindir o separarse de otro modo del oligonucleótido uno de los dos marcadores. En ciertas realizaciones, una sonda de nucleasa 5’ se marca con dos colorantes fluorescentes diferentes, por ejemplo, un colorante indicador del extremo 5’ y el colorante o resto interruptor del extremo 3’. En algunas realizaciones, las sondas de nucleasa 5’ están marcadas en una o más posiciones distintas de, o además de, posiciones terminales. Cuando la sonda está intacta, se produce típicamente transferencia de energía entre los dos fluoróforos de modo que la emisión fluorescente del colorante indicador se interrumpa al menos en parte. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, una sonda nucleasa 5’ unida a un ácido nucleico molde se escinde por la actividad nucleasa 5’ a 3’ de, por ejemplo, una Taq polimerasa u otra polimerasa que tenga esta actividad de modo que la emisión fluorescente del colorante indicador ya no se interrumpa. También se describen sondas de nucleasa 5’ ejemplares, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.210.015; Patente de Estados Unidos N° 5.994.056; y Patente de Estados Unidos N° 6.171.785. En otras realizaciones, una sonda de nucleasa 5’ puede marcarse con dos o más colorantes indicadores diferentes y un colorante o resto interruptor 3’ terminal.

La expresión “FRET” o “transferencia de energía por resonancia de fluorescencia” o “transferencia de energía por resonancia de Foerster” se refiere a una transferencia de energía entre al menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado interruptor). El donante típicamente transfiere la energía al aceptor cuando el donante se excita por radiación lumínica con una longitud de onda adecuada. El aceptor típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. Cuando el aceptor es un interruptor “oscuro”, este disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Si un fluoróforo particular actúa como un donante o aceptor depende de las propiedades del otro miembro del par de FRET. Los pares de donante-aceptor habitualmente usados incluyen el par FAM-TAMRA. Son interruptores habitualmente usados DABCYL y TAMRA. Los interruptores oscuros habitualmente usados incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

El término “convencional” o “natural” cuando se hace referencia a bases de ácidos nucleicos, nucleósido trifosfatos o nucleótidos se refiere a los que aparecen de forma natural en el polinucleótido que se describe (es decir, para ADN estos son dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Adicionalmente, dITP y 7-desaza-dGTP se utilizan frecuentemente en lugar de dGTP y 7-desaza-dATP puede utilizarse en lugar de dATP en reacciones de síntesis de ADN *in vitro*, tales como secuenciación. Colectivamente, estos pueden denominarse dNTP.

La expresión “no convencional” o “modificado” cuando se hace referencia a una base de ácido nucleico, nucleósido o nucleótido incluye la modificación, derivaciones o análogos de bases, nucleósidos o nucleótidos convencionales que aparecen de forma natural en un polinucleótido particular. Ciertos nucleótidos no convencionales se modifican en la posición 2’ del azúcar ribosa en comparación con dNTP convencionales. Por lo tanto, aunque para ARN los nucleótidos de origen natural son ribonucleótidos (es decir, ATP, GTP, CTP, UTP, colectivamente rNTP), debido a que estos nucleótidos tienen un grupo hidroxilo en la posición 2’ del azúcar, que, por comparación está ausente en dNTP, como se usa en el presente documento, los ribonucleótidos son nucleótidos no convencionales como sustratos para ADN polimerasas. Como se usa en el presente documento, los nucleótidos no convencionales incluyen, pero sin limitación, compuestos usados como terminadores para secuenciación de ácido nucleico. Los compuestos terminadores ejemplares incluyen pero sin limitación los compuestos que tienen una estructura 2’, 3’ didesoxi y se denominan didesoxinucleósido trifosfatos. Los didesoxinucleótido trifosfatos ddATP, ddTTP, ddCTP y

ddGTP se denominan colectivamente ddNTP. Los ejemplos adicionales de compuestos terminadores incluyen análogos 2'-PO₄ de ribonucleótidos (véase, por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos N° 2005/0037991 y 2005/0037398). Otros nucleótidos no convencionales incluyen fosforotioato dNTP ([[α]-S]dNTP), 5'-[α]-borano-dNTP, [α]-metil-fosfonato dNTP y ribonucleósido trifosfatos (rNTP). Las bases no convencionales pueden marcarse con isótopos radiactivos tales como ³²P, ³³P o ³⁵S; marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes; marcadores bioluminiscentes; marcadores de haptenos tales como biotina; o marcadores enzimáticos tales como estreptavidina o avidina. Los marcadores fluorescentes pueden incluir colorantes que tiene carga negativa, tales como colorantes de la familia de fluoresceína, o colorantes que son de carga neutra, tales como colorantes de la familia de rodamina, colorantes que tienen carga positiva, tales como colorantes de la familia de cianina. Los colorantes de la familia de fluoresceína incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los colorantes de la familia de rodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G y TAMRA. Diversos colorantes o nucleótidos marcados con FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, Texas Red y TAMRA se comercializan por Perkin-Elmer (Boston, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA), o Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). Los colorantes de la familia de cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 y se comercializan por GE Healthcare UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en las que la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que la base de ácido nucleico idéntica o resto de aminoácido aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si tienen un porcentaje específico de nucleótidos o restos de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad sobre una región específica), cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, o más típicamente sobre una región que es de 100 a 500 o 100 o más nucleótidos de longitud.

Las expresiones "similitud" o "porcentaje de similitud", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos que son iguales o similares como se define por sustituciones de aminoácidos conservativas (por ejemplo, 60 % de similitud, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % similares sobre una región específica), cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí si son al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o al menos 55 % similares entre sí. Opcionalmente esta similitud existe sobre una región que es de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o más típicamente sobre una región que es de al menos aproximadamente 100 a 500 o 1000 o más aminoácidos de longitud.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se usan habitualmente los parámetros de los programas por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después los porcentajes de identidad o similitud de secuencias para las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de las varias posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias. Se conocen bien en la técnica métodos de alineamiento de secuencias para comparación. Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1970), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988),

mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

5 Son algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (Nuc. Acids Res. 25: 3389-402, 1997), y Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990), respectivamente. Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden con o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra de vecindario (Altschul *et al.*, mencionado anteriormente). Estos aciertos de palabra del vecindario iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae por debajo de la cantidad X desde su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1989) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas.

30 El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-87, 1993). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de menor suma ($P(N)$), que proporciona un indicio de la probabilidad de que se produzca al azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de menor suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, típicamente menor de aproximadamente 0,01 y más típicamente menor de aproximadamente 0,001.

La expresión "diferenciación de desapareamiento" se refiere a la capacidad de un biocatalizador (por ejemplo, una enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similares) para distinguir una secuencia completamente complementaria de una secuencia que contiene un desapareamiento cuando se extiende un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente de molde uniendo (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos con el ácido nucleico. La expresión "diferenciación de desapareamiento 3'" se refiere a la capacidad de un biocatalizador para distinguir una secuencia completamente complementaria de una secuencia que contiene desapareamiento (casi complementaria) en la que el ácido nucleico para extender (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) tiene un desapareamiento en el extremo 3' terminal del ácido nucleico en comparación con el molde con el que hibrida el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico para extender comprende un desapareamiento en el extremo 3' en relación con la secuencia completamente complementaria. En algunas realizaciones, el ácido nucleico para extender comprende un desapareamiento en la penúltima posición 3' ($N-1$) y/o en la posición $N-2$ en relación con la secuencia completamente complementaria.

50 La expresión "valor C_p " o valor de "punto de cruce" se refiere a un valor que permite la cuantificación del aporte de ácidos nucleicos diana. El valor C_p puede determinarse de acuerdo con el método de máximo de segunda derivada (Van Luu-The, *et al.*, "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction", BioTechniques, Vol. 38, N° 2, febrero de 2005, pp. 287-293). En el método de segunda derivada, un C_p corresponde al primer pico de una curva de segunda derivada. Este pico corresponde al comienzo de una fase lineal logarítmica. El método de segunda derivada calcula un valor de segunda derivada de una curva de intensidad de fluorescencia en tiempo real, y solamente se obtiene un valor. El método de C_p original se basa en una aproximación diferenciable, localmente definida, de los valores de intensidad, por ejemplo, por una función polinómica. Después se calcula la tercera derivada. El valor de C_p es la menor raíz de la tercera derivada. La C_p también puede determinarse usando el método de punto de ajuste, en el que el C_p se determina por la intersección de una paralela a la línea de umbral en la región lineal logarítmica (Van Luu-The, *et al.*, BioTechniques, Vol. 38, N° 2, febrero de 2005, pp. 287-293). Esos cálculos se llevan a cabo fácilmente por cualquier experto en la materia.

65 La expresión "eficacia de PCR" se refiere a una indicación de la eficacia de amplificación de ciclo a ciclo para el molde de cebador perfectamente coincidente. La eficacia de PCR se calcula para cada condición usando la

ecuación: % de eficacia de PCR = $(10^{-(\text{pendiente})} - 1) \times 100$, en la que la pendiente se calculó por regresión lineal con el número de copias logarítmico representado en el eje y y C_p representado en el eje x.

5 El término "múltiple" se refiere a una amplificación con más de un conjunto de cebadores, o a la amplificación de más de un sitio de polimorfismo en una única reacción.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 representa un alineamiento de secuencia de aminoácidos del dominio de polimerasa de ADN polimerasas ejemplares de diversas especies de bacterias: especie de *Thermus* Z05 (Z05) (SEC ID N°: 12), *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID N°: 13), *Thermus filiformis* (Tfi) (SEC ID N°: 14), *Thermus flavus* (Tfl) (SEC ID N°: 15), especie de *Thermus* Sps17 (Sps17) (SEC ID N°: 16), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID N°: 17), *Thermus caldophilus* (Tca) (SEC ID N°: 18), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID N°: 19), *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEC ID N°: 20), *Thermosipho africanus* (Taf) (SEC ID N°: 21), *Deinococcus radiodurans* (Dra) (SEC ID N°: 23), *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (SEC ID N°: 24) y *Bacillus caldotenax* (Bca) (SEC ID N°: 25). Además, las regiones polipeptídicas mostradas comprenden el motivo de aminoácidos A-G-X₁-X₂-F-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L (SEC ID N°: 26), cuyas posiciones variables se definen adicionalmente en el presente documento. Este motivo se destaca en negrita para cada secuencia de polimerasa. Las posiciones de aminoácidos susceptibles de mutación de acuerdo con la presente invención se indican con un asterisco (*).

20 La Figura 2 proporciona identidades de secuencia entre las siguientes enzimas ADN Polimerasa I: ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN de polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi); ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl); ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17); ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth); ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca); ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra); ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma); ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne); ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf); ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst); y ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca). (A) Identidades de secuencia sobre la enzima polimerasa I completa (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05); y (B) identidad de secuencia sobre el subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05.

30 Descripción detallada

La presente invención proporciona ADN polimerasas mejoradas en las que se ha identificado que uno o más aminoácidos en el dominio de polimerasa mejoran una o más actividades o características de polimerasa. Las ADN polimerasas de la invención son enzimas activas que tienen actividad de diferenciación de desapareamiento 3' aumentada (es decir, es menos probable que las polimerasas de la invención descritas en el presente documento extiendan cebadores que tienen desapareamiento con el molde en o cerca del extremo 3' del cebador) en relación con la forma no modificada de la polimerasa que es de otro modo idéntica excepto por la diferencia de aminoácido indicada en el presente documento. Las ADN polimerasas son útiles en una diversidad de aplicaciones que implican la extensión de polinucleótidos o amplificación de moldes polinucleotídicos, incluyendo, por ejemplo, aplicaciones en los estudios de ADN recombinante y diagnóstico médico de enfermedad.

Polimerasas de la invención

45 Se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-X₁-X₂-Phe-X₃-X₄-X₅-Ser-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-X₁-X₂-F-X₃-X₄-X₅-S-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L); en el que:

50 X₁ es His (H), Glu (E) o Gln (Q);
X₂ es Pro (P), Thr (T) o Glu (E);
X₃ es Asn (N) o His (H);
X₄ es Leu (L) o He (I);
X₅ es Asn (N) o Arg (R);
55 X₇ es Arg (R), Pro (P), o Ser (S);
X₈ es Asp (D), Lys (K) o Thr (T);
X₉ es Leu (L) o Val (V);
X₁₀ es Glu (E), Ser (S), Ala (A) o Gly (G);
X₁₁ es Arg (R), Asn (N), Tyr (Y), Thr (T) o Val (V);
60 X₁₂ es Val (V) o He (I);
X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F) o Tyr (Y);
X₁₄ es Asp (D) o Glu (E); y
X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID N°: 8).

65 En algunas realizaciones, X₁₃ se selecciona de G, A, V, L, I, M, W, P, S, T, C, N, Q, D, E, K, R o H (SEC ID N°: 49).

También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo (correspondiente a *Thermus* y *Thermotoga*):

Ala-Gly-X₁-Pro-Phe-Asn-X₄-Asn-Ser-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-S-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L); en el que:

- X₁ es His (H) o Glu (E);
- X₄ es Leu (L) o Ile (I);
- X₇ es Arg (R) o Pro (P);
- X₈ es Asp (D) o Lys (K);
- X₉ es Leu (L) o Val (V);
- X₁₀ es Glu (E) o Ser (S);
- X₁₁ es Arg (R) o Asn (N);
- X₁₂ es Val (V) o Ile (I);
- X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F);
- X₁₄ es Asp (D) o Glu (E); y
- X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID N°: 9).

También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-Glu-Arg-Val-Leu-X₁₃-Asp-Glu-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X₁₃-D-E-L); en el que:

- X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F) (SEC ID N°: 10).

En algunas realizaciones, pueden caracterizarse ADN polimerasas de la invención por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-Glu-Arg-Val-Leu-X₁₃-Asp-Glu-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X₁₃-D-E-L); en el que:

- X₁₃ es Ala (A), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y), Asp (D) o Lys (K) (SEC ID N°: 11).

En algunas realizaciones, pueden caracterizarse ADN polimerasas de la invención por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-Glu-Arg-Val-Leu-X₁₃-Asp-Glu-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X₁₃-D-E-L); en el que:

- X₁₃ es Ala (A), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Asp (D) o Lys (K) (SEC ID N°: 48).

También se desvelan ADN polimerasas que pueden comprender sustituciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo, en las posiciones X₆ y X₁₀ del motivo nativo (SEC ID N°: 26). Las sustituciones adicionales en las posiciones X₆ y X₁₀ también pueden dar como resultado diferenciación de desapareamientos 3' aumentada. Por lo tanto, en algunas realizaciones, pueden caracterizarse ADN polimerasas de la invención por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-X₁-X₂-Phe-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-X₁-X₂-F-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L); en el que

- X₁ es His (H), Glu (E) o Gln (Q);
- X₂ es Pro (P), Thr (T) o Glu (E);
- X₃ es Asn (N) o His (H);
- X₄ es Leu (L) o Ile (I);
- X₅ es Asn (N) o Arg (R);
- X₆ es cualquier aminoácido;
- X₇ es Arg (R), Pro (P), o Ser (S);
- X₈ es Asp (D), Lys (K) o Thr (T);
- X₉ es Leu (L) o Val (V);
- X₁₀ es cualquier aminoácido;
- X₁₁ es Arg (R), Asn (N), Tyr (Y), Thr (T) o Val (V);
- X₁₂ es Val (V) o Ile (I);
- X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F) o Tyr (Y);
- X₁₄ es Asp (D) o Glu (E); y
- X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID N°: 42)

También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-X₁-Pro-Phe-Asn-X₄-Asn-X₆-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L); en el que

- 5 X₁ es His (H) o Glu (E);
 X₄ es Leu (L) o Ile (I);
 X₆ es cualquier aminoácido;
 X₇ es Arg (R) o Pro (P);
 X₈ es Asp (D) o Lys (K);
 10 X₉ es Leu (L) o Val (V);
 X₁₀ es cualquier aminoácido;
 X₁₁ es Arg (R) o Asn (N);
 X₁₂ es Val (V) o Ile (I);
 X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F);
 15 X₁₄ es Asp (D) o Glu (E); y
 X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID Nº: 43)

También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo (correspondiente a ADN polimerasas derivadas de *Thermus* y *Thermotoga*):

20 Ala-Gly-X₁-Pro-Phe-Asn-X₄-Asn-Ser-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-Arg-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-S-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-R-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L); en el que:

- 25 X₁ es His (H) o Glu (E);
 X₄ es Leu (L) o Ile (I);
 X₇ es Arg (R) o Pro (P);
 X₈ es Asp (D) o Lys (K);
 X₉ es Leu (L) o Val (V);
 30 X₁₀ es Glu (E) o Ser (S);
 X₁₂ es Val (V) o Ile (I);
 X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F);
 X₁₄ es Asp (D) o Glu (E); y
 X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID Nº: 44).

35 También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-X₆-Arg-Asp-Gln-Leu-X₁₀-Arg-Val-Leu-X₁₃-Asp-Glu-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L); en el que

- 40 X₆ es cualquier aminoácido;
 X₁₀ es cualquier aminoácido; y
 X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F) (SEC ID Nº: 45).

45 También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-X₆-Arg-Asp-Gln-Leu-X₁₀-Arg-Val-Leu-X₁₃-Asp-Glu-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L); en el que

- 50 X₆ es cualquier aminoácido distinto de Ser (S);
 X₁₀ es cualquier aminoácido distinto de Glu (E); y
 X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F) (SEC ID Nº: 46).

55 También se desvelan ADN polimerasas que pueden caracterizarse por tener el siguiente motivo:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-X₆-Arg-Asp-Gln-Leu-X₁₀-Arg-Val-Leu-X₁₃-Asp-Glu-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L); en el que

- 60 X₆ es Ser (S), Gly (G), Ala (A), Asp (D), Phe (F), Lys (K), Cys (C), Thr (T) o Tyr (Y);
 X₁₀ es Glu (E), Ser (S), Gln (Q), Ala (A), Gly (G), Lys (K) o Arg (R); y
 X₁₃ es Ala (A), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y), Asp (D) o Lys (K) (SEC ID Nº: 47).

65 Este motivo está presente dentro del dominio de "pulgar" de muchas ADN polimerasas dependientes de ADN de tipo Familia A, particularmente ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas (Li *et al.*, EMBO J. 17: 7514-7525, 1998). Por ejemplo, la Figura 1 muestra un alineamiento de secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia nativa correspondiente al motivo anterior en ADN polimerasas de varias especies de bacterias:

Escherichia coli, *Bacillus caldodenax*, *Bacillus stearothermophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermosipho africanus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus* sp. Sps17, *Thermus* sp. Z05, y *Thermus thermophilus*. Como se muestra, el motivo de SEC ID N°: 8 (excepto cuando X13 es F) está presente en cada una de estas polimerasas, lo que indica una función conservada para esta región de la polimerasa. La Figura 2 proporciona identidades de secuencias entre estas ADN polimerasas.

En consecuencia, en algunas realizaciones, se desvela una polimerasa que comprende SEC ID N°: 8, 9, 10 u 11 (por ejemplo, cuando se selecciona X₃, según sea apropiado en la secuencia consenso, de G, A, V, L, I, M, W, P, S, T, C, N, Q, D, E, K, R, H o Y), que tienen la actividad y/o las características mejoradas descritas en el presente documento, y en la que la ADN polimerasa es de otro modo una ADN polimerasa de tipo silvestre o una de origen natural, tal como, por ejemplo, una polimerasa de cualquiera de las especies de bacterias termófilas enumeradas anteriormente, o es sustancialmente idéntica a dicha ADN polimerasa de tipo silvestre o de origen natural. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa como se desvela comprende SEC ID N°: 8, 9, 10 o 11 y es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41. En una variación, la forma no modificada de la polimerasa es de una especie del género *Thermus*. También se desvela que la polimerasa no modificada es de una especie termófila distinta de *Thermus*, por ejemplo, *Thermotoga*. Están disponibles las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos completas para numerosas ADN polimerasas termoestables. Las secuencias de cada una de las polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID N°: 2), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID N°: 6), especie de *Thermus* Z05 (SEC ID N°: 1), especie de *Thermus* Sps17 (SEC ID N°: 5), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID N°: 38) y *Thermosipho africanus* (Taf) (SEC ID N°: 37) se han publicado en la Publicación de Patente Internacional de PCT N° WO 92/06200. La secuencia para la ADN polimerasa de *Thermus flavus* (SEC ID N°: 4) se ha publicado en Akhmetzjanov y Vakhitov (Nucleic Acids Research 20: 5839, 1992). La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus caldophilus* (SEC ID N°: 7) se encuentra en EMBL/GenBank N° de Referencia U62584. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* puede recuperarse de la ATCC N° de Depósito 42380 usando, por ejemplo, los métodos proporcionados en la Patente de Estados Unidos N° 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la Tabla 1. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana* (SEC ID N°: 39) es de la Base de Datos de Patentes GeneSeq N° de Referencia R98144 y el documento PCT WO 97/09451. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Bacillus caldodenax* (SEC ID N°: 41) se describe, por ejemplo, en Uemori *et al.* (J Biochem (Tokio) 113(3): 401-410, 1993; véase también, base de datos Swiss-Prot N° de Referencia Q04957 y GenBank N° de Referencia D12982 y BAA02361). También se describen ejemplos de formas no modificadas de ADN polimerasas que pueden modificarse como se describe en el presente documento en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.228.628; 6.346.379; 7.030.220; 6.881.559; 6.794.177; 6.468.775; y Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 20040005599; 20020012970; 20060078928; 20040115639. También se proporcionan en la lista de secuencias secuencias de polimerasa de longitud completa representativas.

En algunas realizaciones, la polimerasa de la invención, además de tener un dominio de polimerasa que comprende SEC ID N°: 8, 9, 10 u 11, también comprende un dominio de nucleasa (por ejemplo, correspondiente a las posiciones 1 a 291 de Z05).

También se desvela una polimerasa que es una polimerasa quimérica, es decir, que comprende regiones polipeptídicas de dos o más enzimas. Se describen ejemplos de dichas ADN polimerasas quiméricas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.228.628. Son particularmente adecuadas las ADN polimerasas de la familia CS quiméricas, que incluyen las polimerasas CS5 (SEC ID N°: 29) y CS6 (SEC ID N°: 30) y variantes de las mismas que tienen identidad o similitud de secuencia sustancial con la SEC ID N°: 29 o SEC ID N°: 30 (típicamente al menos 80 % de identidad de secuencia y más típicamente al menos 90 %, más típicamente al menos 95 % de identidad de secuencia) y pueden por lo tanto modificarse para contener SEC ID N°: 8. Las ADN polimerasas CS5 y CS6 son enzimas quiméricas derivadas de ADN polimerasas Z05 de *Thermus* sp. y *Thermotoga maritima* (Tma). Comprenden el dominio nucleasa 5' N terminal de la enzima de *Thermus* y la exonucleasa 3'-5' C terminal y los dominios de polimerasa de la enzima Tma. Estas enzimas tienen actividad transcriptasa inversa eficaz, pueden extender cebadores que contienen análogos de nucleótidos, y pueden utilizar alfa-fosforotioato dNTP, dUTP, dITP y también dNTP marcados con familias de colorantes de fluoresceína y cianina. Las polimerasas CS5 y CS6 también son enzimas de PCR activadas por Mg²⁺ eficaces. Las polimerasas quiméricas CS5 y CS6 se describen adicionalmente, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0005599.

En algunas realizaciones, la polimerasa de la invención comprende la SEC ID N°: 8, 9, 10 u 11 y comprende además uno o más cambios de aminoácidos adicionales (por ejemplo, por sustitución, adición o delección de aminoácidos) en comparación con una polimerasa nativa. En algunas realizaciones, dichas polimerasas conservan el motivo de aminoácidos de SEC ID N°: 8 (o un motivo de SEC ID N°: 9, 10 u 11), y comprenden además el motivo de aminoácido de SEC ID N°: 27 (correspondiente a la mutación D580X de Z05 (SEC ID N°: 1)) de la siguiente manera:

T-G-R-L-S-S-X₇-X₈-P-N-L-Q-N; en el que

X₇ es Ser (S) o Thr (T); y
X₈ es cualquier aminoácido distinto de D o E (SEC ID N°: 27)

La mutación caracterizada por SEC ID N°: 27 se analiza en más detalle, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2009/0148891. En algunas realizaciones, dichas polimerasas variantes funcionales típicamente tendrán identidad o similitud de secuencia sustancial con la polimerasa de tipo silvestre o de origen natural (por ejemplo, SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 39, 40, 41, 42, 43 o 44), típicamente al menos 80 % de identidad de secuencia y más típicamente al menos 90 %, más típicamente al menos 95 % de identidad de secuencia.

En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición X₁₃ se sustituye con un aminoácido como se expone en SEC ID N°: 8, 9, 10 u 11, y el aminoácido en la posición X₈ se sustituye con un aminoácido como se expone en SEC ID N°: 27. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aminoácido en la posición X₁₃ es cualquier aminoácido distinto de Phe (F) y el aminoácido en la posición X₈ es cualquier aminoácido distinto de Asp (D) o Glu (E). En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos incluyen Leucina (L), Glicina (G), Treonina (T), Glutamina (Q), Alanina (A), Serina (S), Asparagina (N), Arginina (R) y Lisina (K) en la posición X₈ de SEC ID N°: 27. En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos incluyen de forma independiente Alanina (A), Glicina (G), Serina (S), Treonina (T), Tirosina (Y), Ácido Aspártico (D) o Lisina (K) en la posición X₁₃, y Glicina (G) en la posición X₈. Otra sustitución u otras sustituciones de aminoácidos adecuadas en uno o más de los sitios identificados pueden determinarse usando, por ejemplo, métodos conocidos de mutagénesis dirigida y determinación del rendimiento de extensión de polinucleótidos en ensayos descritos adicionalmente en el presente documento o conocidos de otro modo por expertos en la materia.

Debido a que la longitud precisa de ADN polimerasas varía, las posiciones de aminoácidos precisas correspondientes a cada una de X₁₃ y X₈ pueden variar dependiendo de la polimerasa particular usada. Están disponibles fácilmente programas de alineamiento de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, los indicados anteriormente) y, dados los motivos particulares identificados en el presente documento, sirven para ayudar en la identificación de los aminoácidos exactos (y codones correspondientes) para la modificación de acuerdo con la presente invención. Las posiciones correspondientes a cada una de X₁₃ y X₈ se muestran en la Tabla 1 para ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas y ADN polimerasas termoestables de especies termófilas ejemplares.

Tabla 1. Posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de motivo X₆, X₁₀, X₁₃ (por ejemplo, de SEC ID N°: 8, 9, 10 y 11) y X₈ (de SEC ID N°: 27) en polimerasas ejemplares.

Organismo o Secuencia Quimérica	Posición de Aminoácido			
	X ₆	X ₁₀	X ₁₃	X ₈ (de SEC ID N°: 27)
Consenso (SEC ID N°:)				
<i>T. thermophilus</i> (6)	488	493	497	580
<i>T. caldophilus</i> (7)	488	493	497	580
<i>T. sp. Z05</i> (1)	488	493	497	580
<i>T. aquaticus</i> (2)	486	491	495	578
<i>T. flavus</i> (4)	485	490	494	577
<i>T. filiformis</i> (3)	484	489	493	576
<i>T. sp. Sps17</i> (5)	484	489	493	576
<i>T. maritima</i> (38)	548	553	557	640
<i>T. neapolitana</i> (39)	548	553	557	640
<i>T. africanus</i> (37)	548	553	557	639
<i>B. caldotenax</i> (41)	530	535	539	621
<i>B. stearothermophilus</i> (40)	530	535	539	620
CS5 (29)	548	553	557	640
CS6 (30)	548	553	557	640

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa de la presente invención deriva de ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (SEC ID N°: 1) o una variante de la misma (por ejemplo, que porta la mutación D580G o similares). Como se ha indicado anteriormente, en la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp., la posición X₆ corresponde a Serina (S) en la posición 488; la posición X₁₀ corresponde a Ácido glutámico (E) en la posición 493; y la posición X₁₃ corresponde a Fenilalanina (F) en la posición 497; la posición X₈ corresponde Aspartato (D) en la posición 580. Por lo tanto, en ciertas variaciones de la invención, la polimerasa mutante comprende al menos una sustitución de un aminoácido,

- en relación con una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp., en S488, E493, F497 y D580. Por lo tanto, típicamente, el aminoácido en la posición S488 no es S. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 488 se selecciona de G, A, V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R o H. En ciertas realizaciones, el resto de aminoácido en la posición S488 es G, A, D, F, K, C, T o Y. Típicamente, el aminoácido en la posición E493, si se sustituye, no es E.
- 5 En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 493 se selecciona de G, A, V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, S, K, R o H. En ciertas realizaciones, el resto de aminoácido en la posición E493 puede estar sustituido o no sustituido, y es E, S, A, Q, G, K o R. Típicamente, el aminoácido en la posición F497, si se sustituye, no es F. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 497 se selecciona de G, A, V, L, I, M, S, W, P, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R o H. En ciertas realizaciones, el resto de aminoácido en la posición F497 puede sustituirse o no sustituirse, y es F, A, S, G, T, Y, D o K. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos en la posición D580 pueden seleccionarse de Leucina (L), Glicina (G), Treonina (T), Glutamina (Q), Alanina (A), Serina (S), Asparagina (N), Arginina (R) y Lisina (K). Los mutantes de ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. incluyen los que comprenden la sustitución o las sustituciones de aminoácidos F497A, F497G, F497S, F497T, F497Y, F497D o F497K y D580G.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, la ADN polimerasa de la invención deriva de una especie de *Thermus*, y el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 es un aminoácido que tiene una cadena lateral polar, sin carga (por ejemplo, N, Q, H, S, T o Y), una cadena lateral no polar, sin carga (distinta de F, por ejemplo, G, A, L, M, W, P, C, V o I), una cadena lateral polar, con carga positiva (por ejemplo, R o K), o una cadena lateral polar, con carga negativa (por ejemplo, D o E) a pH neutro (por ejemplo, aproximadamente pH 7,4). En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral polar, sin carga, es S, T o Y. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral no polar, sin carga es A o G. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral polar, con carga positiva es K. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 497 de SEC ID N°: 1 que tiene una cadena lateral polar, con carga negativa es D.
- 20
- 25

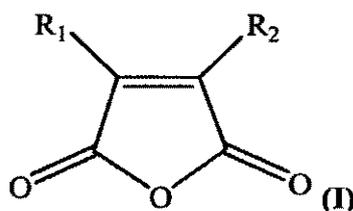
En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la presente invención pueden incluir también otra modificación u otras modificaciones no de sustitución. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, modificaciones covalentes conocidas en la técnica para conferir una ventaja adicional en aplicaciones que comprenden extensión de polinucleótidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la ADN polimerasa mutante incluye además una modificación covalente térmicamente reversible. Las ADN polimerasas que comprenden dichas modificaciones térmicamente reversibles son particularmente adecuadas para aplicaciones de inicio en caliente, tales como, por ejemplo, diversas técnicas de PCR de inicio en caliente. Se describen reactivos modificadores térmicamente reversibles susceptibles de uso de acuerdo con las ADN polimerasas mutantes de la presente invención, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.773.258 de Birch *et al.*

30

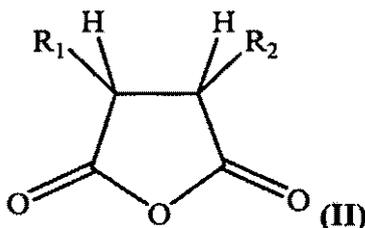
35

Por ejemplo, se producen polimerasas particularmente adecuadas que comprenden una modificación covalente térmicamente reversible mediante una reacción, llevada a cabo a pH alcalino a una temperatura que es menor de aproximadamente 25 °C, de una mezcla de una enzima termoestable y un anhídrido de ácido dicarboxílico que tiene una fórmula general como se expone en la siguiente fórmula I:

40



45 donde R₁ y R₂ son radicales de hidrógeno u orgánicos, que pueden estar unidos; o que tienen la siguiente fórmula II:



50 donde R₁ y R₂ son radicales orgánicos, que pueden estar unidos, y los hidrógenos están en cis, esencialmente como se describe en Birch *et al.*, mencionado anteriormente.

Las ADN polimerasas de la presente invención pueden construirse mutando las secuencias de ADN que codifican la polimerasa no modificada correspondiente (por ejemplo, una polimerasa de tipo silvestre o una variante correspondiente de la que deriva la polimerasa de la invención), tal como usando técnicas denominadas habitualmente mutagénesis dirigida. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la forma no modificada de la polimerasa pueden mutarse por una diversidad de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) en el Capítulo 14; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

Como ejemplo no limitante, el sistema de dos cebadores utilizado en el kit de Mutagénesis Dirigida Transformer de Clontech, puede emplearse para introducir mutantes dirigidos en un polinucleótido que codifica una forma no modificada de la polimerasa. Después de desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores con el plásmido; uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida deseada, el otro contiene una mutación en otro punto en el plásmido que da como resultado la eliminación de un sitio de restricción. Después se lleva a cabo síntesis de segunda cadena, uniendo estrechamente estas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de *E. coli*. Se aísla ADN plasmídico de las bacterias transformadas, restringido con la enzima de restricción relevante (linealizando de este modo los plásmidos no mutados), y después se volvió a transformar en *E. coli*. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin necesidad de subclonación o generación de fagémidos monocatenarios. El enlace estrecho de las dos mutaciones y la linealización posterior de plásmidos no mutados dan como resultado alta eficacia de mutación y permite exploración mínima. Después de la síntesis del cebador de sitio de restricción inicial, este método requiere el uso de solamente un nuevo tipo de cebador por cada sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, puede sintetizarse un conjunto de cebadores oligonucleotídicos "degradados diseñados" para introducir todas las mutaciones deseadas en un sitio dado simultáneamente. Los transformantes pueden explorarse secuenciando el ADN plasmídico a través de la región mutada para identificar y clasificar clones mutantes. Cada ADN mutante puede después restringirse y analizarse por electroforesis, tal como por ejemplo, en un gel de Potenciación de la Detección de Mutación (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) para confirmar que no se han producido otras alteraciones en la secuencia (por comparación de desplazamiento de bandas con el control no mutado). Como alternativa, la región de ADN completa puede secuenciarse para confirmar que no se han producido acontecimientos de mutación adicionales fuera de la región diana.

Pueden emplearse dobles cadenas mutantes verificadas en vectores de sobreexpresión pET (u otros) para transformar *E. coli* tal como, por ejemplo, pLysS de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), para alto nivel de producción de la proteína mutante, y purificación por protocolos convencionales. El método de mapeo de FAB-MS, por ejemplo, puede emplearse para comprobar rápidamente la fidelidad de la expresión de mutantes. Esta técnica proporciona segmentos de secuenciación por toda la proteína y proporciona la confianza necesaria en la asignación de secuencia. En un experimento de mapeo de este tipo, la proteína se digiere con una proteasa (la elección dependerá de la región específica para modificar ya que este segmento de gran interés y el mapa restante debería ser idéntico al mapa de proteína no mutada). El conjunto de fragmentos de escisión se fracciona, por ejemplo, por HPLC de microorificios (fase inversa o intercambio iónico, de nuevo dependiendo de la región específica para modificar) para proporcionar varios péptidos en cada fracción, y los pesos moleculares de los péptidos se determinan por métodos convencionales, tales como FAB-MS. La masa determinada de cada fragmento se compara después con los pesos moleculares de péptidos que se esperan de la digestión de la secuencia predicha, y se determina rápidamente la corrección de la secuencia. Ya que este enfoque de mutagénesis para la modificación de proteínas es dirigido, no sería necesaria secuenciación del péptido alterado si los datos de MS coinciden con la predicción. Si es necesario verificar un resto cambiado, puede emplearse MS/MS en tándem con CAD para secuenciar los péptidos de la mezcla en cuestión, o el péptido diana puede purificarse para degradación de Edman de sustracción o digestión con carboxipeptidasa Y dependiendo de la localización de la modificación.

Pueden generarse ADN polimerasas mutantes con más de un aminoácido sustituido de diversas maneras. En el caso de aminoácidos localizados cerca entre sí en la cadena polipeptídica, pueden mutarse simultáneamente usando un oligonucleótido que codifica todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Si, sin embargo, los aminoácidos se localizan a alguna distancia entre sí (separados por más de diez aminoácidos, por ejemplo) es más difícil generar un único oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, pueden emplearse uno de dos métodos alternativos. En el primer método, se genera un oligonucleótido separado para cada aminoácido para sustituir. Los oligonucleótidos se hibridan después con el ADN molde monocatenario simultáneamente, y la segunda cadena de ADN que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Un método alternativo implica dos o más ciclos de mutagénesis para producir el mutante deseado. El primer ciclo es como se ha descrito para los mutantes individuales: se usa ADN que codifica la polimerasa no modificada para el molde, se hibrida un oligonucleótido que codifica la primera sustitución o las primeras sustituciones de aminoácidos deseadas con este molde, y se genera después la molécula de ADN de heterodúplex. El segundo ciclo de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en el primer ciclo de mutagénesis como el molde. Por lo tanto, este molde ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la sustitución o las sustituciones de aminoácidos deseadas adicionales se hibrida después con este molde, y la cadena resultante de ADN codifica ahora mutaciones tanto del primer como del segundo ciclos de mutagénesis. Este ADN resultante

puede usarse como un molde en un tercer ciclo de mutagénesis, y así sucesivamente. Como alternativa, puede utilizarse el método de mutagénesis multisitio de Seyfang y Jin (Anal. Biochem. 324: 285-291. 2004).

En consecuencia, también se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de las ADN polimerasas de la presente invención (por ejemplo, polimerasas que comprenden cualquiera de SEC ID N°: 8, 9, 10, u 11). Usando un ácido nucleico de la presente invención, que codifica una ADN polimerasa de la invención, puede realizarse una diversidad de vectores. Puede usarse en la práctica de la invención cualquier vector que contenga secuencias de replicón y de control que deriven de una especie compatible con la célula hospedadora. En general, los vectores de expresión incluyen regiones de ácido nucleico reguladores de la transcripción y de la traducción unidas operativamente con el ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa mutante. La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Además, el vector puede contener un Elemento Retrorregulador Positivo (PRE) para potenciar la semivida del ARNm transcrito (véase Gelfand *et al.* Patente de Estados Unidos N° 4.666.848). Las regiones de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción serán en general apropiadas para la célula hospedadora usada para expresar la polimerasa. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados, y secuencias reguladoras adecuadas para una diversidad de células hospedadoras. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir, por ejemplo, secuencias promotoras, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. En realizaciones típicas, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias de inicio y terminación de la transcripción. Los vectores también incluyen típicamente una región polienlazadora que contiene varios sitios de restricción para la inserción de ADN ajeno. En ciertas realizaciones, se usan "marcadores de fusión" para facilitar la purificación y, si se desea, la retirada posterior de la secuencia de etiqueta/marcadora, por ejemplo, "Marcador His". Sin embargo, estos son en general innecesarios cuando se purifica una proteína termoactiva y/o termoestable de un hospedador mesófilo (por ejemplo, *E. coli*), en el que puede emplearse una "etapa de calor". La construcción de vectores adecuados que contienen ADN que codifica secuencias de replicación, secuencias reguladoras, genes de selección fenotípicos y la polimerasa mutante de interés se preparan usando procedimientos de ADN recombinante convencionales. Los plásmidos aislados, vectores virales y fragmentos de ADN se escinden, se adaptan y se ligan entre sí en un orden específico para generar los vectores deseados, como se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, NY, 2ª ed. 1989)).

En ciertas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Se conocen bien en la técnica genes de selección y variarán según la célula hospedadora usada. Los genes de selección adecuados pueden incluir, por ejemplo, genes que codifican resistencia a ampicilina y/o tetraciclina, lo que permite que las células transformadas con estos vectores crezcan en presencia de estos antibióticos.

En un aspecto de la presente invención, se introduce un ácido nucleico que codifica una ADN polimerasa de la invención en una célula, bien solo o bien en combinación con un vector. Por "introducir en" o equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la integración, amplificación y/o expresión posterior del ácido nucleico. El método de introducción se dicta en gran medida por el tipo de célula diana. Los métodos ejemplares incluyen precipitación con CaPO₄, fusión de liposomas, LIPOFECTIN®, electroporación, infección viral y similares.

En algunas realizaciones, se usan procariontes como células hospedadoras para las etapas de clonación iniciales de la presente invención. Son particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para producción de moldes de ADN monocatenario usados para mutagénesis dirigida, para explorar muchos mutantes simultáneamente, y para secuenciación de ADN de los mutantes generados. Las células hospedadoras procariontes adecuadas incluyen *E. coli* K12 cepa 94 (ATCC N° 31.446), *E. coli* cepa W3110 (ATCC N° 27.325), *E. coli* K12 cepa DG116 (ATCC N° 53.606), *E. coli* X1776 (ATCC N° 31.537) y *E. coli* B; sin embargo también pueden usarse como hospedadores muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539, y muchas otras especies y géneros de procariontes incluyendo bacilos tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*, y diversas especies de *Pseudomonas*. Las células hospedadoras procariontes u otras células hospedadoras con paredes celulares rígidas se transforman típicamente usando el método de cloruro cálcico como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Como alternativa, puede usarse electroporación para la transformación de estas células. Se exponen técnicas de transformación de procariontes, por ejemplo, en Dower, en Genetic Engineering, Principles and Methods 12: 275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan *et al.*, Meth. Enzymol., 204: 63, 1991. Los plásmidos típicamente usados para transformación de *E. coli* incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 y Bluescript M13, todos los cuales se describen en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Sin embargo, están disponibles también muchos otros vectores adecuados.

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la presente invención se producen cultivando una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la ADN

polimerasa, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la ADN polimerasa. Se conocen bien en la técnica métodos para cultivar células hospedadoras transformadas en condiciones adecuadas para expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente). Las células hospedadoras adecuadas para producción de las polimerasas de vectores plasmídicos que contienen el promotor pL lambda incluyen *E. coli* cepa DG116 (ATCC N° 53606) (véase Patente de Estados Unidos N° 5.079.352 y Lawyer, F.C. *et al.*, PCR Methods and Applications 2: 275-87, 1993). Después de la expresión, la polimerasa puede recogerse y aislarse. Se describen métodos para purificar la ADN polimerasa termoestable, por ejemplo, en Lawyer *et al.*, mencionado anteriormente.

Una vez purificada, puede ensayarse la diferenciación de desapareamiento 3' de la ADN polimerasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la actividad de diferenciación de desapareamiento 3' se determina comparando la amplificación de una secuencia diana perfectamente coincidente con el cebador con la amplificación de una diana que tiene un desapareamiento de una única base en el extremo 3' del cebador. Puede detectarse amplificación, por ejemplo, en tiempo real mediante el uso de sondas TaqMan™. Puede estimarse la capacidad de una polimerasa para distinguir entre las dos secuencias diana comparando los Cp de las dos reacciones. Opcionalmente, puede realizarse amplificación simultánea de un segundo gen diana en cada pocillo y detectarse en un segundo canal óptico como control. Los "valores de Cp Delta" se refieren a la diferencia en el valor entre el Cp asociado con el molde desapareado menos el Cp de la diana coincidente (véase, por ejemplo, los Ejemplos). En algunas realizaciones, las polimerasas mejoradas de la invención tienen un valor Cp delta de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más en comparación con una polimerasa de control idéntica de otro modo que tiene un aminoácido nativo (por ejemplo, N) en la posición X₃ de SEC ID N°: 8. En algunas realizaciones, esta determinación se realiza con los materiales y condiciones precisos expuestos en los ejemplos.

Métodos de la invención

Las ADN polimerasas mejoradas de la presente invención pueden usarse para cualquier fin en el que dicha actividad enzimática sea necesaria o deseada. La ADN polimerasa mejorada puede ser una ADN polimerasa termoactiva o termoestable, como se describe en el presente documento. En consecuencia, en un aspecto de la invención, se proporcionan métodos de extensión de polinucleótidos, incluyendo PCR, usando las polimerasas de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona una ADN polimerasa termoactiva que es útil para extender un molde de ARN o ADN cuando no se requiera amplificación del ácido nucleico molde, por ejemplo, cuando se desee detectar inmediatamente la presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la invención proporciona una ADN polimerasa termoestable que es útil cuando se desee extender y/o amplificar un ácido nucleico diana. Se conocen en la técnica condiciones adecuadas para la extensión de polinucleótidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Véase también Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (4ª ed., John Wiley & Sons 1999)). En general, se atempera un cebador, es decir, se hibrida, con un ácido nucleico diana para formar un complejo de cebador-molde. El complejo de cebador-molde se pone en contacto con la ADN polimerasa mutante y nucleósido trifosfatos en un ambiente adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos en el extremo 3' del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido complementario del ácido nucleico diana. El cebador puede incluir, por ejemplo, uno o más análogos de nucleótidos. Además, los nucleósido trifosfatos pueden ser nucleótidos convencionales, nucleótidos no convencionales (por ejemplo, ribonucleótidos o nucleótidos marcados), o una mezcla de los mismos. En algunas variaciones, la reacción de extensión de polinucleótidos comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. También se conocen en la técnica condiciones adecuadas para la amplificación de ácido nucleico usando una ADN polimerasa y un par de cebadores (por ejemplo, métodos de amplificación por PCR). (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente; Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente; PCR Applications: Protocols for Functional Genomics (Innis *et al.* eds., Academic Press 1999)).

En algunas realizaciones, el uso de las presentes polimerasas, que proporcionan diferenciación de desapareamiento 3' aumentada, permite, por ejemplo, detección de alelos poco habituales. Por ejemplo, la fidelidad de la diferenciación de desapareamiento 3' de una polimerasa particular determina su sensibilidad (capacidad para detectar con precisión cantidades pequeñas de una secuencia diana en presencia de mayores cantidades de una secuencia no diana diferente pero relacionada). Por lo tanto, la diferenciación de desapareamientos 3' aumentada da como resultado mayor sensibilidad para la detección de alelos poco habituales. La detección de alelos poco habituales es útil, por ejemplo, cuando se exploran biopsias u otras muestras con respecto a cambios genéticos poco habituales, por ejemplo, una célula que porta un alelo canceroso en una masa de células normales.

En algunas realizaciones, las polimerasas mejoradas se usan para extensión de polinucleótidos en el contexto de PCR específica de alelo o detección de polimorfismo de un único nucleótido (SNP). Se describen métodos de detección de SNP ejemplares en Chen *et al.*, "Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput" Pharmacogenomics J. 3(2): 77-96 (2003); Kwok *et al.*, "Detection of single nucleotide polymorphisms" Curr. Issues Mol. Biol. 5(2): 43-60 (Abril 2003); Shi, "Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes" Am. J. Pharmacogenomics 2(3): 197-205 (2002); y Kwok, "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms" Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 235-58 (2001). Se describen técnicas ejemplares para detección de SNP de alto rendimiento en Marnellos, "High-throughput SNP analysis for genetic association studies" Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 6(3): 317-21 (mayo de

2003). Los métodos de detección de SNP habituales incluyen, pero sin limitación, ensayos de TaqMan, ensayos de balizas moleculares, matrices de ácidos nucleicos, extensión de cebadores específicos de alelos, PCR específica de alelos, extensión de cebadores en matrices, ensayos de extensión de cebadores homogéneos, extensión de cebadores con detección por espectrometría de masas, pirosecuenciación, extensión de cebadores múltiples clasificados en matrices genéticas, ligamiento con amplificación de círculo rodante, ligamiento homogéneo, OLA (Patente de Estados Unidos N° 4.988.167), reacción de ligamiento múltiple clasificada en matrices genéticas, polimorfismos de longitud de fragmento de restricción, ensayos de marcadores de extensión de una única base, y el ensayo Invader. Dichos métodos pueden usarse en combinación con mecanismos de detección tales como, por ejemplo, detección de luminiscencia o quimioluminiscencia, detección de fluorescencia, detección de fluorescencia resuelta en el tiempo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, polarización de fluorescencia, espectrometría de masas y detección eléctrica.

También puede conseguirse detección de múltiples alelos diferentes usando reacciones múltiples, que permiten la detección de múltiples alelos diferentes en una única reacción. En reacciones múltiples, se usan dos o más cebadores específicos de alelos para extender y amplificar SNP o polimorfismos de múltiples nucleótidos o alelos. Se describen métodos ejemplares para detección múltiple de polimorfismos de nucleótidos individuales y múltiples en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0172324.

Otros métodos para detectar productos de extensión o productos de amplificación usando las polimerasas mejoradas descritas en el presente documento incluyen el uso de colorantes de unión a nucleótidos bicatenarios fluorescentes o colorantes de intercalación de nucleótidos bicatenarios fluorescentes. Los ejemplos de colorantes de unión a ADN bicatenarios fluorescentes incluyen SYBR-green (Molecular Probes).

Los ejemplos de colorantes de intercalación bicatenarios fluorescentes incluyen bromuro de etidio. Los colorantes de unión a ADN bicatenarios pueden usarse junto con análisis de curva de fusión para medir los productos de extensión de cebadores y/o productos de amplificación. El análisis de curva de fusión puede realizarse en un instrumento de PCR en tiempo real, tal como el instrumento ABI 5700/7000 (formato de 96 pocillos) o ABI 7900 (formato de 384 pocillos) con software integrado (SDS 2.1). Como alternativa, el análisis de curva de fusión puede realizarse como un análisis de puntos finales. Se describen métodos ejemplares del análisis del punto de fusión en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0172324.

En otras realizaciones más, las polimerasas de la invención se usan para extensión de cebadores en el contexto de secuenciación de ADN, marcaje de ADN o marcaje de productos de extensión de cebadores. Por ejemplo, la secuenciación de ADN por el método de didesoxinucleótidos de Sanger (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463, 1977) se mejora por la presente invención para polimerasas capaces de incorporar nucleótidos de terminación de cadena, no convencionales. Los avances en el método de Sanger *et al.* básico han proporcionado nuevos vectores (Yanisch-Perron *et al.*, Gene 33: 103-119, 1985) y análogos de bases (Mills *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2232-2235, 1979; y Barr *et al.*, Biotechniques 4: 428-432, 1986). En general, la secuenciación de ADN requiere extensión de cebadores dependiente de molde en presencia de análogos de bases de terminación de cadena, dando como resultado una distribución de fragmentos parciales que se separan posteriormente por tamaño. El procedimiento de secuenciación de dideoxi básico implica (i) hibridar un cebador oligonucleotídico, opcionalmente marcado con un molde; (ii) extender el cebador con ADN polimerasa en cuatro reacciones separadas, que contienen cada una una mezcla de dNTP no marcados y una cantidad limitante de un agente de terminación de cadena tal como ddNTP, opcionalmente marcado; y (iii) resolver los cuatro conjuntos de productos de reacción en un gel de urea/poliacrilamida desnaturalizante de alta resolución. Los productos de reacción pueden detectarse en gel por autorradiografía o por detección de fluorescencia, dependiendo del marcador usado, y la imagen puede examinarse para inferir la secuencia de nucleótidos. Estos métodos utilizan ADN polimerasa tal como el fragmento de Klenow de Pol I de *E. coli* o una ADN polimerasa T7 modificada.

La disponibilidad de polimerasas termoestables, tales como la ADN polimerasa Taq, ha dado como resultado métodos mejorados de secuenciación con ADN polimerasa termoestable (véase Innis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9436, 1988) y modificaciones de los mismos denominados "secuenciación cíclica" (Murray, Nuc Acids Res. 17: 8889, 1989). En consecuencia, las polimerasas termoestables de la presente invención pueden usarse junto con dichos métodos. Como una alternativa a la secuenciación de dideoxi básica, la secuenciación cíclica es una amplificación asimétrica, lineal, de secuencias diana complementarias de la secuencia molde en presencia de terminadores de cadena. Un único ciclo produce una familia de productos de extensión de todas las posibles longitudes. Después de la desnaturalización del producto de reacción de extensión del molde de ADN, se producen múltiples ciclos de hibridación de cebadores y extensión de cebadores en presencia de terminadores tales como ddNTP. La secuenciación cíclica requiere menos ADN molde que la secuenciación de terminación de cadena convencional. Las ADN polimerasas termoestables tienen varias ventajas en la secuenciación cíclica; toleran las temperaturas de hibridación rigurosas que se requieren para hibridación específica de un cebador con dianas de ácido nucleico así como toleran los múltiples ciclos de desnaturalización de alta temperatura que se producen en cada ciclo, por ejemplo, 90-95 °C. Por esta razón, la ADN Polimerasa AMPLITAQ® y sus derivados y descendientes, por ejemplo, ADN Polimerasa AmpliTaq CS y ADN Polimerasa AmpliTaq FS se han incluido en los kits de secuenciación cíclica de Taq comercializados por compañías tales como Perkin-Elmer (Norwalk, CT) y Applied Biosystems (Foster City, CA).

Las polimerasas mejoradas encuentran su uso en la secuenciación 454 (Roche) (Margulies, M *et al.* 2005, Nature, 437, 376-380). La secuenciación 454 implica dos etapas. En la primera etapa, el ADN se corta en fragmentos de aproximadamente 300-800 pares de bases, y los extremos de los fragmentos se hacen romos. Después se ligan adaptadores oligonucleotídicos con los extremos de los fragmentos. Los adaptadores actúan como cebadores para amplificación y secuenciación de los fragmentos. Los fragmentos pueden unirse a perlas de captura de ADN, por ejemplo, perlas recubiertas con estreptavidina usando, por ejemplo, Adaptador B, que contiene el marcador de biotina 5'. Los fragmentos unidos a las perlas se amplifican por PCR en gotas de una emulsión de aceite-agua. El resultado es múltiples copias de fragmentos de ADN amplificados en forma clonal en cada perla. En la segunda etapa, las perlas se capturan en pocillos (de tamaño de picolitros). Se realiza pirosecuenciación en cada fragmento de ADN en paralelo. La adición de uno o más nucleótidos genera una señal luminica que se registra por una cámara CCD en un instrumento de secuenciación. La fuerza de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados.

La pirosecuenciación hace uso del pirofosfato (PPi) que se libera tras la adición de nucleótidos. El PPi se convierte en ATP por ATP sulfurilasa en presencia de adenosina 5' fosfosulfato. La luciferasa usa ATP para convertir luciferina en oxiluciferina, y esta reacción genera luz que se detecta y se analiza.

Las variaciones de los métodos de secuenciación de terminación de cadena incluyen secuenciación de cebador-colorante y secuenciación de terminador-colorante. En la secuenciación de cebador-colorante, los terminadores de ddNTP no están marcados, y se utiliza un cebador marcado para detectar productos de extensión (Smith *et al.*, Nature 32: 674-679, 1986). En secuenciación de ADN de terminador-colorante, se usa una ADN polimerasa para incorporar dNTP y ddNTP marcados con fluorescencia en el extremo de un cebador de ADN (Lee *et al.*, Nuc. Acids. Res. 20: 2471, 1992). Este proceso ofrece la ventaja de no tener que sintetizar cebadores marcados con colorante. Además, las reacciones de terminador-colorante son más convenientes porque las cuatro reacciones pueden realizarse en el mismo tubo.

Los métodos tanto de cebador-colorante como de terminador-colorante pueden automatizarse usando un instrumento de secuenciación automático producido por Applied Biosystems (Foster City, CA) (Patente de Estados Unidos N° 5.171.534). Cuando se usa el instrumento, la mezcla de reacción de secuenciación completa se fracciona en un gel de poliacrilamida desnaturalizante montado en el instrumento. Un láser en la parte inferior del instrumento detecta los productos fluorescentes a medida que se separan electroforéticamente de acuerdo con el tamaño a través del gel.

Se usan habitualmente dos tipos de marcadores fluorescentes para marcar los terminadores usados para secuenciación de terminador-colorante: colorantes fluorescentes zwitteriónicos y con carga negativa. Los colorantes fluorescentes con carga negativa incluyen los de las familias de fluoresceína y BODIPY. Se describen colorantes de BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) en la Publicación de Patente Internacional WO 97/00967. Los colorantes fluorescentes zwitteriónicos incluyen los de la familia de rodamina. Los kits de secuenciación cíclica disponibles en el mercado usan terminadores marcados con derivados de rodamina. Sin embargo, los terminadores marcados con rodamina son más bien costosos y el producto debe separarse de ddNTP-colorante no incorporados antes de cargar en el gel debido a que migran conjuntamente con los productos de secuenciación. Los terminadores de la familia de colorantes de rodamina parecen estabilizar las estructuras en horquilla en regiones ricas en GC, lo que provoca que los productos migren de forma anómala. Esto puede implicar el uso de dITP, que relaja la estructura secundaria pero también afecta a la eficacia de la incorporación del terminador.

Por el contrario, los terminadores marcados con fluoresceína eliminan la etapa de separación antes de cargar en el gel ya que tienen una mayor carga negativa neta y migran más rápido que los productos de secuenciación. Además, los productos de secuenciación marcados con fluoresceína tienen mejor migración electroforética que los productos de secuenciación marcados con rodamina. Aunque la ADN polimerasa Taq de tipo silvestre no incorpora eficazmente terminadores marcados con colorantes de la familia de fluoresceína, esto puede conseguirse ahora eficazmente mediante el uso de las enzimas modificadas como se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0142333. En consecuencia, pueden usarse modificaciones como se describe en el documento US 2002/0142333 en el contexto de la presente invención para producir polimerasas termoestables que incorporan colorantes de la familia de fluoresceína que tienen velocidades de extensión de cebadores mejoradas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la ADN polimerasa no modificada de acuerdo con la presente invención es una polimerasa termoestable modificada como se describe en el documento US 2002/0142333 y que tiene el motivo expuesto en SEC ID N°: 8 (o un motivo de SEC ID N°: 9, 10 u 11), y opcionalmente el motivo de SEC ID N°: 27.

Otros formatos de secuenciación de ácidos nucleicos ejemplares en los que pueden usarse las ADN polimerasas mutantes de la invención incluyen los que implican compuestos terminadores que incluyen análogos de 2'-PO₄ de ribonucleótidos (véase, por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos N° 2005/0037991 y 2005/0037398, y Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/174,488).

Kits

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan kits para su uso en métodos de extensión de cebadores descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit se compartimentaliza para mayor facilidad de uso y contiene al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de la invención que tiene diferenciación de desapareamientos 3' aumentada de acuerdo con la presente invención. También pueden incluirse uno o más recipientes adicionales que proporcionan un reactivo o reactivos adicionales. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualquier reactivo u otros elementos reconocidos por los expertos en la materia para su uso en procedimientos de extensión de cebadores de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, incluyendo reactivos para su uso en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN, o procedimientos de marcaje de ADN. Por ejemplo, ciertas realizaciones, el kit incluye además un recipiente que proporciona un cebador con sentido 5' hibridable, en condiciones de extensión de cebadores, con un molde polinucleotídico predeterminado, o un par de cebadores que comprende el cebador con sentido 5' y un cebador antisentido 3' correspondiente. En algunas realizaciones, el kit incluye uno o más recipientes que contienen uno o más cebadores que son completamente complementarios de polimorfismos de un único nucleótido o polimorfismos de múltiples nucleótidos, en los que los cebadores son útiles para reacciones múltiples, como se ha descrito anteriormente. En otras variaciones, no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan nucleósido trifosfatos (convencionales y/o no convencionales). En realizaciones específicas, el kit incluye alfa fosforotioato dNTP, dUTP, dITP y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP con familia de colorante de fluoresceína o cianina. En otras realizaciones, no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebadores. En algunas realizaciones, el kit incluye una o más sondas marcas o no marcadas. Los ejemplos de sondas incluyen sondas FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) con doble marcaje y sondas de balizas moleculares. En otra realización, el kit contiene un aptámero, por ejemplo, para ensayos de PCR de inicio en caliente.

Mezclas de reacción

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan mezclas de reacción que comprenden las polimerasas con actividad de diferenciación de desapareamientos 3' aumentada, como se describe en el presente documento. Las mezclas de reacción pueden comprender además reactivos para su uso en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de marcaje de ADN. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebadores. Las mezclas de reacción también pueden contener un ácido nucleico (ADN y/o ARN) molde, uno o más polinucleótidos cebadores o sondas, nucleósido trifosfatos (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos marcados, nucleótidos no convencionales), sales (por ejemplo, Mn^{2+} , Mg^{2+}) y marcadores (por ejemplo fluoróforos). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además colorantes de unión a ADN bicatenario, tales como SYBR green, o colorantes de intercalación de ADN bicatenario, tales como bromuro de etidio. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción contienen un cebador con sentido 5' hibridable, en condiciones de extensión de cebadores, con un molde polinucleotídico predeterminado, o un par de cebadores que comprenden el cebador con sentido 5' y un cebador antisentido 3' correspondiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una sonda de hidrólisis de FRET fluorogénica para detección de ácidos nucleicos molde amplificados, por ejemplo, una sonda Taqman®. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene dos o más cebadores que son completamente complementarios de polimorfismos de un único nucleótido o polimorfismos de múltiples nucleótidos. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción contienen alfa-fosforotioato dNTP, dUTP, dITP y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP con familia de colorante de fluoresceína o cianina.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Identificación de ADN polimerasas mutantes con diferenciación de desapareamiento 3' aumentada

Se identificaron mutaciones en polimerasa Z05 D580G que proporcionan una capacidad reducida para extender un cebador oligonucleotídico con un desapareamiento 3' con un molde. Brevemente, las etapas en este proceso de exploración incluyeron generación de bibliotecas, expresión y purificación parcial de las enzimas mutantes, exploración de las enzimas con respecto a la propiedad deseada, secuenciación de ADN, purificación clonar y caracterización adicional de mutantes candidatos seleccionados. Cada una de estas etapas se describe adicionalmente posteriormente.

Generación de bibliotecas clonales: se sometió un ácido nucleico que codificaba el dominio de polimerasa de la ADN polimerasa Z05 D580G a PCR propensa a error (mutagénica) entre los sitios de restricción Bsp I y Bgl II de un plásmido que incluye esta secuencia de ácido nucleico. La secuencia amplificada se proporciona como SEC ID N°: 33. Los cebadores usados para esto se proporcionan a continuación:

ES 2 536 252 T3

Cebador Directo: 5'- CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3' (SEC ID N°: 31); y,

Cebador Inverso: 5'- ATAACCAACTGGTAGTGCGGTGTA-3' (SEC ID N°: 32).

5 Se realizó una PCR usando un intervalo de concentraciones de Mg^{2+} de 1,8-3,6 mM, para generar bibliotecas con un intervalo de tasas de mutación. Las condiciones de tampón fueron Bicina 50 mM pH 8,2, KOAc 115 mM, glicero 8 % p/v y cada dNTP 0,2 mM. Se usó una enzima de PCR de Inicio en Caliente GeneAmp® AccuRT a 0,15 U/ μ l. Comenzando con 5×10^5 copias de ADN plasmídico Z05 D580G linealizado por cada volumen de reacción de 50 μ l, las reacciones se desnaturalizaron usando una temperatura de 94 °C durante 60 segundos, después se realizaron
10 30 ciclos de amplificación, usando una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 15 segundos, una temperatura de hibridación de 60 °C durante 15 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C durante 120 segundos, y seguido de una extensión final a una temperatura de 72 °C durante 5 minutos.

15 El amplicón resultante se purificó con un Kit de Purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos) y se cortó con Bsp I y Bgl II, y después se volvió a purificar con un Kit de Purificación de PCR QIAquick. Se preparó un plásmido de vector Z05 D580G cortando con las mismas dos enzimas de restricción y tratando con fosfatasa alcalina, recombinante (RAS, cat N° 03359123001) y se purificó con un Kit de Purificación de PCR QIAquick. El vector cortado y el inserto mutado se mezclaron en una relación 1:3 y se trataron con ADN ligasa T4 durante 5 minutos a temperatura ambiente (Kit NEB Quick Ligation™). Los ligamientos se purificaron con un Kit de
20 Purificación de PCR QIAquick y se transformaron en una cepa hospedadora de *E. coli* por electroporación.

Las alícuotas de los cultivos expresados se sembraron en medio selectivo de ampicilina para determinar el número de transformantes únicos en cada transformación. Las transformaciones se almacenaron a -70 °C hasta -80 °C en presencia de glicerol como crioprotector.

25 Cada biblioteca se extendió después en placas de agar selectivo por ampicilina de gran formato. Se transfirieron colonias individuales a placas de 384 pocillos que contenían caldo Luria 2X con ampicilina y glicerol 10 % p/v usando un seleccionador de colonias automático (QPix2, Genetix Ltd). Estas placas se incubaron durante una noche a 30 °C para permitir que los cultivos crecieran y después se almacenaron a -70 °C hasta -80 °C. El glicerol añadido al caldo Luria 2X fue suficientemente bajo para permitir el crecimiento de cultivo pero suficientemente alto para proporcionar crioprotección. Se prepararon varios miles de colonias a varios niveles de mutagénesis (Mg^{2+}) de esta manera para uso posterior.

35 *Preparación de bibliotecas de extractos parte 1-fermentación:* a partir de las bibliotecas clonales descritas anteriormente, se preparó una biblioteca correspondiente de extractos parcialmente purificados adecuados para fines de exploración. La primera etapa de este proceso fue realizar cultivos de expresión a pequeña escala de cada clon. Estos cultivos se dejaron crecer en formato de 96 pocillos; por lo tanto hubo 4 placas de cultivo de expresión para cada placa de biblioteca de 384 pocillos. Se transfirieron 0,5 μ l de cada pocillo de la placa de biblioteca clonal a un pocillo de una placa de siembra de 96 pocillos, que contenía 150 μ l de Medio A (véase Tabla 3 posterior). Esta
40 placa de siembra se agitó durante una noche a 1150 rpm a 30 °C, en un incubador/agitador de placas iEMS (ThermoElectron). Estos cultivos de siembra se usaron después para inocular el mismo medio, inoculando esta vez 20 μ l en 250 μ l de Medio A en placas de 96 pocillos de gran formato (Nunc N° 267334). Estas placas se incubaron durante una noche a 37 °C con agitación. El plásmido de expresión contenía elementos de control de la transcripción, que permiten la expresión a 37 °C pero no a 30 °C. Después de incubación durante una noche, los
45 cultivos expresaron la proteína clonal a típicamente 1-10 % de proteína celular total. Las células de estos cultivos se recogieron por centrifugación. Estas células se congelaron (-20 °C) o se procesaron inmediatamente, como se describe posteriormente.

Tabla 2. Medio A (esterilizado por filtración antes de su uso)

Componente	Concentración
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
Ácido cítrico·H ₂ O	2 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
NaNH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O	3,5 g/l
MgSO ₄	2 mM
Casamino ácidos	2,5 g/l
Glucosa	2 g/l
Tiamina·HCl	10 mg/l

Componente	Concentración
Ampicilina	100 mg/l

5 *Preparación de bibliotecas de extractos parte 2-extracción:* se resuspendieron sedimentos celulares de la etapa de fermentación en 25 μ l de tampón de Lisis (Tabla 3 posterior) y se transfirieron a placas de termociclación de 384 pocillos y se sellaron. Obsérvese que el tampón contenía lisozima para ayudar en la lisis celular, y DNasa para retirar el ADN del extracto. Para lisar las células las placas se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, se congelaron durante una noche a -20 °C, y se incubaron de nuevo a 37 °C durante 15 minutos. Se añadió sulfato de amonio (1,5 μ l de una solución 2 M) y las placas se incubaron a 75 °C durante 15 minutos para precipitar e inactivar proteínas contaminantes, incluyendo las nucleasas añadidas de forma exógena. Las placas se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de termociclación de 384 pocillos nueva. Estas placas de extractos se congelaron a -20 °C para uso posterior en exploraciones. Cada pocillo contenía aproximadamente 0,5-3 μ M de la enzima polimerasa de la biblioteca de mutantes.

Tabla 3. Tampón de lisis

Componente	Concentración o Porcentaje
Tris pH 7.5	50 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	6 mM
Tween 20	0,5 % v/v
Lisozima (a partir de polvo)	1 mg/ml
DNasa I	0,05 Unidades/ μ l

15 *Exploración de bibliotecas de extractos con respecto a la tasa de extensión de desaparimiento de cebador 3' reducida:* la biblioteca de extractos se exploró comparando la tasa de extensión de un cebador perfectamente coincidente con un molde oligonucleotídico frente a la tasa de extensión de un cebador con un desaparimiento G:T 3'.

20 Los extractos enzimáticos anteriores se diluyeron 10 veces para reacciones de extensión de cebadores combinando 2,5 μ l de extracto con 22,5 μ l de un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y Tween-20 0,2 % en una placa de termociclación de 384 pocillos, cubriendo y calentando durante 10 minutos a 90 °C. Las reacciones de control con cebador perfectamente coincidente combinaron 0,5 μ l del extracto diluido con 15 μ l de la mezcla maestra en placas de PCR de 384 pocillos. La extensión del molde con cebador se controló cada 10 segundos en un termociclador cinético modificado usando una cámara CCD (véase, Watson, mencionado anteriormente). La mezcla maestra contenía molde de cebador con cebador 50 nM, Tricina 25 mM, pH 8,3, KOAc 100 mM, SYBR Green I 0,6X, cada dNTP 200 μ M, Aptámero 100 nM y Acetato de Magnesio 2,5 mM. Para distinguir la fluorescencia derivada de extensión de la fluorescencia de fondo, se incluyeron pocillos paralelos en el experimento en los que se evitaba la extensión de la cadena del cebador dejando fuera los nucleótidos de la mezcla maestra de reacción. Se realizaron reacciones con el cebador desapareado 3' como anteriormente excepto que se añadieron 1,5 μ l del extracto diluido a cada reacción y se sustituyó con Acetato de Manganeso 1,5 mM el Acetato de Magnesio. Tanto el aumento de la cantidad del extracto tres veces como el uso de Manganeso como el activador metálico hacen la extensión con desaparimiento más probable y por lo tanto mejoran la selectividad de la exploración con respecto a las enzimas con la mayor capacidad para diferenciar frente a extensión de desaparimiento 3'.

35 Se exploraron aproximadamente 5000 extractos mutantes usando el protocolo anterior. Aproximadamente el 7 % del grupo original se seleccionó para reexploración basándose en un valor de extensión de cebadores perfectamente coincidentes por encima de un punto de corte arbitrario y una baja relación de extensión con desaparimiento frente a perfectamente coincidente. Se tomaron muestras de los pocillos de cultivos correspondientes a los extractos superiores para medio de crecimiento nuevo y se volvieron a cultivar para producir nuevas placas de cultivo que contienen los mejores mutantes, así como varios cultivos parentales para usar para comparación. Estas placas de cultivo se usaron después para preparar nuevos extractos que se volvieron a explorar para confirmar el fenotipo de exploración original. Las tasas de extensión de cebadores para las reacciones con los cebadores perfectamente coincidentes 3' y los desapareados 3' se calcularon como la pendiente del aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo para la parte lineal de la curva. La relación de la pendiente de extensión desapareada dividida por la pendiente de extensión perfectamente coincidente se usó para clasificar y seleccionar los mejores candidatos. Se incluyen en la siguiente tabla clones seleccionados para la reexploración, más para comparación del clon parental Z05 D580G, con sus genotipos y fenotipos respectivos.

Tabla 4.

Enzima	Pendiente de Coincidencia Perfecta	Pendiente de Desapareamiento	Pendiente MM / Pendiente PM
Z05 D580G	8,29	8,04	0,97
Z05 D580G F497S	5,01	0,11	0,02

Diversas Sustituciones de Aminoácidos en la posición Z05 F497: se examinó el efecto de diversas sustituciones en la posición F497 de la ADN polimerasa Z05 en diferenciación de desapareamiento en PCR específica de alelos. Estas sustituciones se crearon tanto en la ADN polimerasa Z05 como en la ADN polimerasa Z05 D580G clonando fragmentos génicos sintéticos en vectores para una o ambas enzimas y las enzimas mutantes expresadas se purificaron y cuantificaron. Se compararon los mutantes de Z05 F497 A (Alanina), G (Glicina), S (Serina), T (Treonina) e Y (Tirosina); y mutantes de Z05 D580G D (Ácido Aspártico) y K (Lisina) con su enzima parental respectiva en un ensayo de PCR específica de alelo.

Las ADN polimerasas de control de este ejemplo son una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. de SEC ID N°: 1 o una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. de SEC ID N°: 1 excepto que el aminoácido en la posición 580 es Glicina (por ejemplo, una sustitución D580G) (en lo sucesivo en el presente documento polimerasa Z05 D580G).

Se usaron cebadores que amplifican una región del gen de BRAF humano y son perfectamente coincidentes con la diana cuando dicha diana porta una mutación en el codón 600 de BRAF, V600K. Frente a la diana de BRAF de tipo silvestre, presente en ADN genómico humano, el cebador selectivo de alelo da como resultado un único desapareamiento A:C en el extremo 3'. El cebador común es perfectamente coincidente con el gen de BRAF, como lo es la secuencia de sonda, que permite detección de la amplificación por TaqMan, en tiempo real. Cada reacción tuvo 10.000 copias (33 ng) de ADN de línea celular Genómica Humana de tipo silvestre, o bien 10.000 copias o 100 copias de un plásmido linealizado que contenía la secuencia mutante BRAF V600R en un volumen final de 16 µl. Para permitir los diferentes óptimos salinos de las enzimas, se realizaron amplificaciones usando un intervalo de concentraciones de KCl de 25 a 130 mM. Las condiciones de tampón fueron Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 2,5 mM, cada dNTP 0,2 mM, UNG 0,02 U/µl y Aptámero 200 nM. Los cebadores Directo e Inverso estuvieron a 100 nM y la sonda estuvo a 25 nM. Todas las ADN polimerasas se ensayaron a 20 nM y se añadió tampón de almacenamiento enzimático 2 % (v/v) (glicerol 50 % v/v, KCl 100 mM, Tris 20 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween 20 0,5 %) a las reacciones. Las reacciones se realizaron en un termociclador Roche LightCycler 480 y se desnaturalizó usando una temperatura de 95 °C durante 60 segundos, después se realizaron 99 ciclos de amplificación, usando una temperatura de desnaturalización de 92 °C durante 10 segundos y una temperatura de hibridación de 62 °C durante 30 segundos.

Las reacciones fueron por duplicado, se calcularon los puntos de cruce ("Cp") por el método de Cuantificación de Abs/Máx 2ª derivada y se promediaron los Cp. Se calculó la eficacia de PCR a partir de la pendiente de las reacciones de plásmidos perfectamente coincidentes de 100 y 10.000 copias a la concentración de KCl que diera como resultado el Cp de plásmidos perfectamente coincidentes de 10.000 copias más temprano. El Cp delta de altas copias es igual a la diferencia entre los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de la diana genómica de tipo silvestre desapareada 3' y los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana de plásmido perfectamente coincidente.

La tabla 5 a continuación contiene los valores de Cp promedio a la concentración de KCl para cada enzima que dio como resultado el Cp de plásmido de altas copias más temprano y la eficacia de PCR calculada y Cp delta de altas copias. La ADN polimerasa Z05 D580G F497S que se identificó en la exploración de mutantes inicial como se ha descrito anteriormente se incluye para referencia. Los datos indican que varias sustituciones de aminoácidos en la posición F497 de la ADN polimerasa Z05 dan como resultado diferenciación mejorada de desapareamientos de cebadores en PCR selectiva de alelos.

Tabla 5. Cp de amplificación del plásmido mutante BRAF V600K frente a ADN genómico humano

Enzima	100 copias de plásmido mutante	10.000 copias de plásmido mutante	10.000 copias de ADNg humano	Óptimo de KCl	Eficacia de PCR	Delta Cp de Altas Copias (ADNg-plásmido)
Z05	31,3	24,5	26,8	100	96,1	2,3
Z05 F497A	39,1	30,1	43,2	25	67,7	13,1
Z05 F497G	39,6	30,6	43,8	25	66,5	13,3
Z05 F497S	39,5	30,7	44,3	25	69,1	13,6
Z05 F497T	40,7	31,4	46,7	25	64,0	15,3

ES 2 536 252 T3

Enzima	100 copias de plásmido mutante	10.000 copias de plásmido mutante	10.000 copias de ADNg humano	Óptimo de KCl	Eficacia de PCR	Delta Cp de Altas Copias (ADNg-plásmido)
Z05 F497Y	31,0	24,3	26,6	100	98,1	2,4
Z05 D580G*	31,2	24,3	26,3	115	96,3	2,0
Z05 D580G F497D	37,0	28,9	40,8	25	76,9	12,0
Z05 D580G F497K	35,9	27,9	40,7	55	76,9	12,8
Z05 D580G F497S	34,3	26,8	34,7	55	84,1	7,9
* Promedio de 4 experimentos						

Este ejemplo demuestra que las enzimas mutantes F497A, F497G, F497S, F497T, F497Y, F497D, F497K tienen una detección de alelos poco habituales mejorada en relación con las enzimas parentales de control Z05 y Z05 D580G.

5 *Ejemplo 2:* identificación de polimerasas mutantes adicionales con diferenciación de desapareamientos 3' aumentada

10 Este ejemplo demuestra que diversas sustituciones en la posición E493 de la ADN polimerasa Z05 dan como resultado diferenciación de desapareamientos 3' aumentada. Estas sustituciones se crearon como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se compararon los mutantes de Z05 E493 G (Glicina), K (Lisina) y R (Arginina); y los mutantes de Z05 D580G A (Alanina), G (Glicina), K (Lisina) y R (Arginina) con su enzima parental respectiva en un ensayo de PCR específica de alelo.

15 Las enzimas de control y condiciones de reacción fueron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. La tabla 6 muestra que varias sustituciones de aminoácidos en la posición E493 de la ADN polimerasa Z05 dan como resultado diferenciación mejorada de desapareamientos de cebadores en PCR selectiva de alelos cuando se comparan con las enzimas parentales, Z05 y Z05 D580G.

20 **Tabla 6. Cp de amplificación de plásmido mutante BRAF V600K frente a ADN genómico humano usando enzimas Z05 mutantes E493**

Enzima	100 copias de plásmido mutante	10.000 copias de plásmido mutante	10.000 copias de ADNg	KCl Óptimo	Eficacia de PCR	Delta Cp de Altas Copias (ADNg-plásmido)
Z05	31,3	24,5	26,8	100	96,1	2,3
Z05 E493G	31,1	24,5	27,7	85	100,8	3,2
Z05 E493K	33,4	26,3	30,3	100	90,9	4,0
Z05 E493R	31,7	24,7	29,2	85	94,1	4,5
Z05 D580G*	31,2	24,3	26,3	115	96,3	2,0
Z05 D580G E493A	31,0	24,1	26,2	115	93,3	2,1
Z05 D580G E493G	30,9	24,2	27,1	115	98,5	2,9
Z05 D580G E493K	31,6	24,9	31,5	100	99,1	6,6
Z05 D580G E493R	31,0	24,2	27,9	115	97,6	3,7
* Promedio de 4 experimentos						

Este ejemplo demuestra que las enzimas mutantes E493A, E493G, E493K y E493R tienen detección de alelos poco habituales mejorada en relación con ambas polimerasas de control, Z05 y Z05 D580G.

5 *Ejemplo 3:* identificación de polimerasas mutantes adicionales con diferenciación de desapareamiento 3' aumentada

Este ejemplo muestra que las polimerasas que tienen una mutación en la posición S488 de una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. tienen diferenciación de desapareamientos 3' aumentada.

10 Las ADN polimerasas de control y condiciones de reacción fueron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. La tabla 7 muestra que varias sustituciones de aminoácidos en la posición S488 de la ADN polimerasa Z05 dan como resultado mejora de la diferenciación de desapareamientos de cebadores en PCR selectiva de alelos.

Tabla 7. Cp de amplificación de plásmido mutante BRAF V600K frente a ADN genómico humano

Enzima	100 copias de plásmido mutante	10.000 copias de plásmido mutante	10.000 copias de ADNg humano	KCl Óptimo	Eficacia de PCR	Delta Cp de Altas Copias (ADNg-plásmido)
Z05	31,3	24,5	26,8	100	96,1	2,3
Z05 S488C	34,8	27,1	36,8	40	81,6	9,7
Z05 S488F	34,3	26,8	35,2	40	84,6	8,4
Z05 S488G	32,5	25,4	30,4	70	90,1	5,0
Z05 S488T	33,4	26,2	34,1	55	89,7	8,0
Z05 S488Y	33,8	26,4	34,6	55	86,1	8,2
Z05 D580G*	31,2	24,3	26,3	115	96,3	2,0
Z05 D580G S488A	31,0	24,2	26,9	100	96,3	2,7
Z05 D580G S488D	32,1	25,0	31,6	70	92,4	6,5
Z05 D580G S488F	32,3	25,2	30,6	85	91,3	5,4
Z05 D580G S488G	31,1	24,5	28,2	100	99,5	3,7
Z05 D580G S488K	31,4	24,6	29,9	100	95,8	5,4

* Promedio de 4 experimentos

15 Este ejemplo demuestra que las enzimas mutantes S488C, S488F, S488G, S488T, S488Y, S488A, S488D y S488K tienen detección de alelos poco habituales mejorada en relación con las enzimas de control parentales, Z05 y Z05 D580G.

20 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son solamente para fines ilustrativos y que se les sugerirán a personas expertas en la materia diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

Listado informal de secuencias

25 SEC ID N°: 1 ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05)

MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVFDAKAPSFRRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
 AKKAEREGYEVRIILTADRDLVQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGIKTALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
 DPLEVDFARRREPDREGLRAFLELFEFGSLLHEFGLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 PPMWAEKALAAACKEGRVHRAKDPLAGLKDLKEVRGLLAKDLAVLALREGLDLAPSDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDAHRALLAERLQONLLERLKGEKLLWLYQEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRLDVAYLKALSLELAEEIRRLEEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPGLVHPTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNIPIRTPLGQIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFGVSPAEVDPLMRRAAKTVNFVGLYGMSAHRLSQELAI PYEEAVA
 FIERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRKRKYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQ
 GTAADLMK LAMVKLFPHLREMGARMLLQVHDELLEAPQARAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGIGEDWLSAKG

SEC ID N°: 2 ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDAVI
 VVFDKAPSFRRHEAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLASLA
 KKAKEGYEVRIILTADKDLVQLLSDRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRDPQWADYRALTGDE
 SDNLPGVKIGIKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRKPAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDL
 PLEVDFAKRREPDRERLRAFLELFEFGSLLHEFGLLESPKALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKE
 PMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPMLLAY
 LLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVL
 AHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIG
 KTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQT
 ATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFIAEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIR
 VFQEGRDIHTETASWMFGVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAI PYEEAQAFI
 ERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRRRKYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGT
 AADLMK LAMVKLFPRL EEMGARMLLQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEV
 EVGIGEDWLSAKE

5

SEC ID N°: 3 ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)

MLPLLEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGEVAIVVF
 DAKAPSFRRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLLEVPGFEADDVLATLARKA
 EREGYEVRIILSADRDLVQLLSDRIHLLHPEGEVLT PGWLQERYGLSPERWVEYRALVGDPSDN
 LPGVPGIGIKTALKLLKEWGSLEAILKNLDQVKPERVWEAIRNNLDKQLQMSLELSRLRTDLPL
 EVDFAKRREP TGKGLKAFLERLEFGSLLHEFGLLEAPKEAEEAPWPPPPGGAFGLGFLLSRPEPM
 WAELLALAGAKEGRVHRAEDPVGALKDLKEIRGLLAKDLSVLALREGREIPPGDDPMLLAYLL
 DPGNTNPEGVARRYGGEWKEDAAARALLSERLWQALYPRVAEEERLLWLYREVERPLAQLVAH
 MEATGVRLDVPYLEALSQEVAFELERLEAEVHRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPPIGKT
 EKTGKRSTSAAVLELLREAHPIVGRILEYRELMK LKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFNQTAT

ATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRKAFIAEEGHLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVF
 REGKDIHTETAAWMFGVPPPEGVDGAMRRAAKTVNFVGLYGMSAHRLSQELSI PYEEAAAFIER
 YFQSFPKVRAWIAKTL EEGRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGTAA
 DLMK LAMVKLFPRLRPLGVRI LLQVHDELVL EAPKARAEAAQLAKETMEGVYPLSVPLEVEV
 GMGEDWLSAKE

10

SEC ID N°: 4 ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

MAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVVVV
 VFDKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLVLEVPGFEEADDVLATLAK
 RAEKEGYEVRILTADRDLYQLLSERIAILLHPEGYLITPAWLYEKYGLRPEQWVDYRALAGDPS
 DNI PGVKGIGEKTAQRLIREWGSLENLFQHLQVVKPSLREKLQAGMEALALSRKLSQVHTDLP
 LEVDFGRRRTPNLEGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLEGPKAAEEAPWPPPEGAFLGFSFSRPEP
 MWAELLALAGAWEGRLHRAQDPLRGLRDLKGVIRILAKDLAVLALREGLDLFPEDDPMLLAYL
 LDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDEGERALLAERLFQTLKERLKGEEERLLWLYEEVEKPLSRVLA
 RMEATGVRLDVAYLQALSLEVEAEVRQLEEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGK
 TEKTGKRSTSAVLEALREAHPIVDRILOQYRELTKLKNTYIDPLPALVHPKTGRLHTRFNQTA
 TATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFVAEEGWLVLDYSQIELRVLAHLSGDENLIRV
 FQEGRDIHTQTASWMFGVSPGVDPMLMRAAKTINFGVLYGMSAHLRSQELSI PYEEAVAFIE
 RYFQSYPKVRAWIEGTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGTAA
 ADLMKMLAMVRLFPRLQELGARMMLQVHDELVL EAPKDRAERVAALAKEVMEGVWPLQVPLEVE
 VGLGEDWLSAKE

SEC ID N°: 5 ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17)

MLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGEVAIVVF
 DAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLVLEVPGFEEADDVLATLAKKA
 EREGYEVRI LSADRDLYQLLSDRIHLLHPEGEVLT PGWLQERYGLSPERWVEYRALVGDPSDN
 LPGVPGIGEK TALKLLKEWGSLEAILKNLDQVKPERVREAIRNNLDKQLMSLELSRLRTDLP
 EVDFAKRREP DWGLKAFLEERLEFGSLLHEFGLLEAPKEAEEAPWPPPPGGAFLGFLLSRPEPM
 WAELLALAGAKEGRVHRAEDPVGALKDLKEIRGLLAKDLSVLALREGREIPPGDDPMLLAYLL
 DPGNTNPEGVARRYGGEWKEDAAARALLSERLWQALYPRVAEEERLLWLYREVERPLAQLVAH
 MEATGVRLDVPYLEALSQEVAFELERLEAEVHRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPPIGKT
 EKTGKRSTSAVLELLREAHPIVGRILEYRELMKLKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFNQATAT
 ATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRKAFIAEEGHLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVF
 REGKDIHTETAAMWFGVPPGVVDGAMMRAAKTVNFGVLYGMSAHLRSQELSI PYEEAAAFIER
 YFQSF PKVRAWIAKTLEEGRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGTAA
 5 DLMLKMLAMVKLF PRLRPLGVRI LLQVHDELVL EAPKARAEAAQLAKETMEGVYPLSVPLEVEV
 GMGEDWLSAKA

SEC ID N°: 6 ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

MEAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVFDKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGYEADDVLATL
 AKKAEKEGYEVRILTADRDLYQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLRPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKGIGEK TALKLLKEWGSLENLLKNLDRVKPENVREKIKAHLEDLRLSLELSRVRT
 DLPLEVDLAQGREPDREGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFLGFSVLSR
 PEPMWAELKALAACRDGRVHRAADPLAGLKDLEVRGLLAKDLAVLASREGLDLVPGDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDEAHRALLSERLHRNLLKRLEGEKLLWLYHEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRRDVAYLQALSLELAEEIRRLEEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPSLVHPRTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFGVPPAVDPLMRAAKTVNFGVLYGMSAHLRSQELAI PYEEAVA
 FIERYFQSF PKVRAWIEKTLEEGRKRKYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQ
 10 GTAADLMKMLAMVKLF PRLREMGARMMLQVHDELLEAPQARAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGMGEDWLSAKG

SEC ID N°: 7 ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tea)

MEAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFASLLKALKEDGYKAV
 FVVFDAKAPSFRRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGYEADDVLATL
 AKNPEKEGYEVRIILTADRDLQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWQKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGIKTALKLLKEWGSLENLLKNLDRVKPENVREKIKAHLEDLRLSLELSRVRT
 DLPLEVDLAQGREPDREGLRAFLEFGLSLLHEFGLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 PEPMAELKALAACRDGRVHRAADPLAGLKDLEKVRGLLAKDLAVLASREGLDLVPGDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDAHRALLSERLHRNLLKRLQGEKLLWLYHEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRLDVAYLQALSLELAEEIRRLEEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNYVDPLPSLVHPNTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFOEGKDIHTQTASWFMFGVPPEAVDPLMRRAAKTVNFGVLYGMSAHLRSQELAI PYEEAVA
 FIERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRKRKYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNPVQ
 GTAADLMK LAMVKLF PRLREMGARMLLQVHDELLEAPQAGAE EVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGMGEDWLSAKG

SEC ID Nº: 8

5 A-G-X1-X2-F-X3-X4-X5-S-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L en la que X1 es H, E o Q; X2 es P, T o E; X3 es N o H; X4 es L o I; X5 es N o R; X7 es R, P, o S; X8 es D, K o T; X9 es L o V; X10 es E, S, A o G; X11 es R, N, Y, T o V; X12 es V o I; X13 es un aminoácido distinto de F o Y; X14 es D o E; y X15 es E o K.

SEC ID Nº: 9

10 A-G-X1-P-F-N-X4-N-S-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L en la que X1 es H o E; X4 es L o I; X7 es R o P; X8 es D o K; X9 es L o V; X10 es E o S; X11 es R o N; X12 es V o I; X13 es cualquier aminoácido distinto de F; X14 es D o E; y X15 es E o K.

SEC ID Nº: 10

15 A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X13-D-E-L
 en la que X13 es cualquier aminoácido distinto de F (SEC ID Nº: 10).

SEC ID Nº: 11

20 A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X13-D-E-L
 X13 es A, G, S, T, Y, D, o K (SEC ID Nº: 11).

SEC ID Nº: 12 Z05

EEEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPALGKT

SEC ID Nº: 13 Taq

25 EAEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPAIGKT

SEC ID Nº: 14 Tfi

EAEVHRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPPIGKT

SEC ID Nº: 15 Tfl

30 EEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPAIGKT

SEC ID Nº: 16 Sps17

35 EAEVHRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPPIGKT

SEC ID Nº: 17 Tth

EEEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPALGKT

SEC ID Nº: 18 Tea

40 EEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPALGKT

SEC ID Nº: 19 Tma

AAEIIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRGKT

SEC ID Nº: 20 Tne

45 AEKIYQIAGEPFNINSPKQVSNILFEKLGKIPRGKT

SEC ID Nº: 21 Taf

KEKVFEIAGETFNLSSTQVAYILFEKLNIAPIY-KK

SEC ID Nº: 23 Dra
ESQIHEYAGEEFHIRSPKQLETVLYDKLELASSKKT

5 SEC ID Nº: 24 Bst
ERRIYELAGQEFNINSPKQLGTVLFDKLQLPVLKKT

SEC ID Nº: 25 Bca
EQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFEKLQLPVLKKS

10 SEC ID Nº: 26 motivo consenso nativo
A-G-X1-X2-F-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L en la que X1 es H, E o Q; X2 es P, T o E; X3 es N o H; X4 es L o I; X5 es N o R; X6 es S; X7 es R, P, o S; X8 es D, K o T; X9 es L o V; X10 es E, S, A o G; X11 es R, N, Y, T o V; X12 es V o I; X13 es F o Y; X14 es D o E; y X15 es E o K.

15 SEC ID Nº: 27 motivo Z05 D580 modificado
T-G-R-L-S-S-X7-X8-P-N-L-Q-N
en la que X7 es Ser (S) o Thr (T); y X8 es cualquier aminoácido distinto de Asp (D), o Glu (E)

20 SEC ID Nº: 28 Sitio activo de ADN polimerasa conservado
DYSQIELR

SEC ID Nº: 29 ADN polimerasa CS5

**MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFASLLKALKEDGYKAV
FVVFDKAPSFRRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
AKKAEREGYEVRIILTADRDLVQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
PSDNLPGVKGIGEKTKALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
DLPLEVDFARRREPDREGLRAFLEFRGSLLEHEFGLLESEPVGYRIVKDLVEFEKLIIEKLR
ESPSFAIDLETSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDEKEVLKLLKEILEDPG
AKIVGQNLKFDYKVLVKGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRLYKTLSEKLEADLENVYKIEMLVNVLA
RMELNGVYVDTEFLKLLSEEYGKKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRKG
TKTKGDYSTRIEVLEELAGEHEIIPLILEYRKIQKPKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQGT
TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIVPQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDENLLR
AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
VNYFVLYPKVRDYIQRVVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIQOLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
AADI IKLAMI EIDRELKERKMRSKMI IQVHDELVEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKLSVPL
EVDVTIGKTWS**

25 SEC ID Nº: 30 ADN polimerasa CS6

**MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFASLLKALKEDGYKAV
FVVFDKAPSFRRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
AKKAEREGYEVRIILTADRDLVQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
PSDNLPGVKGIGEKTKALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
DLPLEVDFARRREPDREGLRAFLEFRGSLLEHEFGLLESEPVGYRIVKDLVEFEKLIIEKLR
ESPSFAIALATSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDEKEVLKLLKEILEDPG
AKIVGQNLKFDYKVLVKGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRLYKTLSEKLEADLENVYKIEMLVNVLA
RMELNGVYVDTEFLKLLSEEYGKKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRKG
TKTKGDYSTRIEVLEELAGEHEIIPLILEYRKIQKPKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQGT
TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIVPQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDENLLR
AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
VNYFVLYPKVRDYIQRVVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIQOLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
AADI IKLAMI EIDRELKERKMRSKMI IQVHDELVEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKLSVPL
EVDVTIGKTWS**

30

ES 2 536 252 T3

SEC ID N°: 31 Cebador Directo
5'- CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3'

5 SEC ID N°: 32 Cebador Inverso
5'- ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTA-3'

SEC ID N°: 33 Dominio polimerasa de ADN polimerasa Z05 D580G

CTACCTCCTGGACCCCTCCAACACCACCCCGAGGGGGTGGCCCGGCGCTACGGGGGGGAGTG
GACGGAGGACGCCGCCACCGGGCCCTCCTCGCTGAGCGGCTCCAGCAAACCTCTTGGAACG
CCTCAAGGGAGAGGAAAAGCTCCTTTGGCTCTACCAAGAGGTGGAAAAGCCCTCTCCCGGGT
CCTGGCCACATGGAGGCCACCGGGGTAAGGCTGGACGTGGCCTATCTAAAGGCCCTTTCCCT
GGAGCTTGCGGAGGAGATTTCGCCCTCGAGGAGGAGGTCTTCCGCCTGGCGGGCCACCCCTT
CAACCTGAACCTCCGTGACCAGCTAGAGCGGGTGTCTTTGACGAGCTTAGGCTTCCCGCCCT
GGGCAAGACGCAAAGACGGGGAAGCGCTCCACCAGCGCCGCGGTGCTGGAGGCCCTCAGGGA
GGCCCACCCCATCGTGGAGAAGATCCTCCAGCACCAGGAGCTCACCAGCTCAAGAACACCTA
CGTAGACCCCTCCCGGGCTCGTCCACCCGAGGACGGGCGCCTCCACACCCGCTTCAACCA
GACAGCCACGGCCACGGGAAGGCTCTCTAGCTCCGGGCCAACCTGCAGAACATCCCCATCCG
CACCCCTTGGGCCAGAGGATCCGCCGGCCCTTCTGGCCGAGGCGGGATGGGCGTTGGTGGC
CCTGGACTATAGCCAGATAGAGCTCCGGGTCTTCGCCACCTCTCCGGGACGAGAACCTGAT
CAGGGTCTTCCAGGAGGGGAAGGACATCCACACCCAGACCGCAAGCTGGATGTTCCGGCGTCTC
CCCGGAGGCCGTGGACCCCTGATGCGCCGGGCGGCCAAGACGGTGAACCTTCGGCGTCTCTA
CGGCATGTCCGCCATAGGCTCTCCAGGAGCTTGCCATCCCCACGAGGAGGCGGTGGCCTT
TATAGAGCGCTACTTCCAAAGCTTCCCAAGGTGCGGGCCTGGATAGAAAAGACCCTGGAGGA
GGGGAGGAAGCGGGGCTACGTGGAAACCTCTTCGGAAGAAGGCGCTACGTGCCCGACCTCAA
CGCCCGGTGAAGAGCGTCAGGGAGGCCGCGGAGCGCATGGCCTTCAACATGCCCGTCCAGGG
CACCGCCGCCACCTCATGAAGCTCGCCATGGTGAAGCTCTTCCCCACCTCCGGGAGATGGG
GGCCCGCATGCTCCTCCAGGTCCACGACGAGCTCCTCCTGGAGGCCCCCAAGCGCGGGCCGA
GGAGGTGGCGGCTTTGGCCAAGGAGGCCATGGAGAAGGCCTATCCCCTCGCCGTGCCCTTGA
GGTGGAGGTGGGGATCGGGGAGGACTGGCTTTCCGCCAAGGGCTGATATCAGATCTCCCTGAT

TATGCGTCAGTCTATGAAGAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAGAATCCTTGTGAATTT
AACAGAGGGTATAGGGATTACACGCCACTACCAGTTGGTTAT

10 SEC ID N°: 34 - secuencia de tipo silvestre de BRAF

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTT
TGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA

15 SEC ID N°: 35 - secuencia mutante de BRAF V600R

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAGGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTT
TGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA

SEC ID N°: 36 ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

MADASPDPSKPDALVLI DGHALAFRSYFALPPLNNSK GEMTDAIVGFMKLLRLRLARQKSNQVI
 VVFDPPVKTLRHEQYEGYKSGRAQTPEDLRGQINRIRALVDALGFPRLEEPGYEADDVIA SLT
 RMAEGKGYEVRI VTSDRDAYQLLDEHVKVIANDFSLIGPAQVEEKYGVTVRQWVDYRALTGDA
 SDNI PGAKGIGPKTAAKLLQEYGTLEKVYEAHAGTLKPDGTRKLLDSEENVKFSHDLSCMV
 TDLPLDIEFGVRRLPDNPLVTEDLLTELELHSLRPMILGLNGPEQDGHAPDDLLEREHAQTPE
 EDEAAALPAFSAPELAEWQTPAEGAVWGYVLSREDDLTAALLAAATFEDGVARPARVSEPDEW
 AQAEAPENLFGELLPSDKPLTKKEQKALEKAQKDAEKARAKLREQFPATVDEAEFVGQRTVTA
 AAKALAAHLSVRGTVVEPGDDPLLAYLLDPANTNMPVVAKRYLDREWPADAPTRAAITGHL
 VREL PPLDDARRKMYDEMEKPLSGVLGRMEVRGVQVDSDFLQTL SIQAGVRLADLESQIHEY
 AGEEFHIRSPKQLETVLYDKLELASSKKTGQRSTAVSALEPLRDAHP I I PLVLEFRELDK
 LRGTYLDP I PNLVNPHTGRLHTTFAQTAVATGR LSSLNPNLQNIPIRSELGREIRKGFIAEDG
 FTLIAADYSQIELRLLAH I ADDPLMQQAFVEGADIHRR TAAQVLGLDEATVDANQRRAAKTVN
 FGVLYGMSAHL SNDLGI PYAEAATFIEIYFATYPGIRRYINHTLDFGRTHGYVETLYGRRY
 VPGLSSRRNVQREAEERLAYNMP I OGTAAIMK LAMVQLDLPQLDAIGARMLLQVHDELLIEAP
 LDKAEQVAALTKKVMENVVQLKVPLAVEVGTGPNWFDTK

SEC ID N°: 37 ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

MGKMFLFDGTGLVYRAFYAIDQSLQTS SGLHTNAVYGLTKMLIKFLKEHISIGKDACVFLDS
 KGGSKKRKDIETYKANRPSTPDLLLEQIPYVEELVDALGIKVLKIEGFEADDIIATLSKKFE
 SDFEKVNIITGDKDLLQLVSDKVFVWRVERGITDLVLYDRNKVIEKYGIYPEQFKDYLSLVGD
 QIDNIPGVKIGKKTAVSLLKKYNSLENVLKNINLLTEKLRRLLEDSKEDLQKSI ELVELIYD
 VPMDVEKDEI IYRGYNPDKLLKVLKKEYFSS I IKELNLQEKLEKEY ILVDNEDKLLKLAEEIE
 KYKTFSIDTETSLDPFEAKLVGISISTMEGKAYYIPVSHFGAKNISKSLIDKFLKQILQEKD
 YNIVGQNLKFDYEIFKSMGFSNVPHFDTMIAAYLLNPDEKRFNLEELSLKYLGYKMI SFDEL
 VNENVPLFGNDFSYPLERAVEYSCEDADV TYRIFRKLGRKIYENEMEKLFYIEMPLIDVLS
 EMELNGVYFDEEYLKELSKKYQEKMDGIKEKVF E I AGETFNLNSSTQVAYILFEKLN I APYKK
 TATGKFSTNAEVL EELSKEHEIAKLLLEYRKYQK LKSTYIDSIPLSINRKTNRVHTTFHQGT
 STGRLSSSNPNLQNL PTRSEEGKEIRKAVRPQRQDWWILGADYSQIELRVLAHVSKDENLLKA
 FKEDLDIHTITAAKIFGVSEMFVSEQMRRVGKMNFAI IYGVSPYGLSKRIGLSVSETKKIID
 NYFRYYKGVFEYLKRMKDEARKKGYVTTLFGRRRYI PQLRSKNGNRVQEGERIAVNTPIQGT
 ADI I KIAMIN IHNRLKKNENLRSKMILQVHDEL VFEVPDNELEI VKDLVRDEMENAVKLDVPLK
 VDVYYGKEWE

5

SEC ID N°: 38 ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)

MARLFLFDGTALAYRAYYALDRSLSTSTG I PTNATYGVARMLVRF IKDHI IVGKDYVAVAFDK
 KAATFRHKLLETYKAQRPKTPDLLIQQLPYIKKLVEALGMKVLEVEGYEADDI IATLAVKGLP
 LFDEIFIVTGDKDMLQLVNEKIKVWRIVKGISDLELYDAQKVKEKYGVPEPQ I PDL LALTGDE
 IDNIPGVTGIGEKTA VQ LLEKYKDLEDILNHVREL PQKVRKALLRDRENA ILSKKLAILETNV
 PIEINWEELRYQGYDREKLLPLLKELEFASIMKELQLYEESEPVGYRIVKDLVEFEKLI EKLR
 ESPSFAIDLETSSLDPFDCDIVGISV SFKPK EAYYIPLHHRNAQNLD EKEVLKLLKEILEDPG
 AKIVGQNLKFDYKVL MVKGVPEVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKNLDDLALKFLGYKMTSYQEL
 MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADIT YRLYKTL SLKLHEADLENV FYKIEMPLVNVLA
 RMELNGVYVDTEFLKLLSEEYGKLEELAE E IYRIAGEPFNINS PKQVSRILFEKLG I KPRGK
 TTKTGDI STRIEVLEELAGEHEI I PLILEYRKI QK LKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAI VQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSG DENLLR
 AFEEGIDVHTLTASRI FNVKPEEVTEEMRRAGKMNFS I IYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
 VNYFVLYPKVRDYIQRVVSEAKEKGYVRTLFG RKRDI PQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
 AADI I KLAMI EIDRELKERKMRSKMI IQVHDEL VFEVPNEEKDALVELVKDRMTNVV KLSVPL
 EVDVTIGKTWS

10

SEC ID N°: 39 ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

MARLFLFDGTALAYRAYYALDRSLSTSTGIPTNAVYGVARMLVKFIKEHI IPEKDYAAVAFDK
 KAATFRHKLLVSDKAQRPKTPALLVQQLPYIKRLIEALGFKVLELEGEYADDI IATLAVRAAR
 FLMRFLITGDKDMLQLVNEKIKVWRIVKGISDLELYDSKKVKERYGVEPHQIPDLLALTGDD
 IDNIPGVTGIGEKTAVQLLGKYRNLEYILEHARELPQRVRKALLRDREVAILSKKLATLVNTA
 PVEVDWEEMKYRGYDKRKLPLILKELEFASIMKELQLYEEAEPTGYEIVKDHKTFEDLIEKLNK
 EVPSFALDLETSSLDPFNCEIVGISVSFKPKTAYYIPLHHRNAHNLDLTVLSKLNKLEILEDPS
 SKIVGQNLKYDYKVLVVKGISPVYPHFDTMIAAYLLEPNEKKNLEEDLSLKLFLGYKMTSYQEL
 MSFSSPLFGFSFADVPVDKAAEYSCEDADITYRLYKILSMKLHEAELENVYRIEMPLVNVLA
 RMEFNWVYVDTEFLKLLSEEYGKLEELAEKIYQIAGEPFNINSPKQVSNILFEKLGKIKPRGK
 TTKTGDYSTRIEVLEEIANEHEIVPLILEFRKILKLNKSTYIDTLPKLVNPKTGRFHASFHQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIVPQDPDWIIVSADYSQIELRILAHLSGDNLVK
 AFEEDIDVHTLTASRIYNVKPEEVNEEMRRVGMVNFSSIIYGVTPYGLSVRLGIPVKEAEKMI
 ISYFTLYPKVRSYIQQVVAEAEKEKGYVRTLFGKRKRDIPQLMARDKNTQSEGERIAINTPIQGT
 AADI IKLAMIDIDEELRKRNMKSRMI IQVHDELVEVPDEEKEELVDLVKNKMTNVVKLSVPL
 EVDISIGKSW

SEC ID N°: 40 ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)

5

MKNKLVLDGNSVAYRAFFALPLLHNDKGIHTNAVYGFMMNLNKLAEEQPTHILVAFDAGKT
 TFRHETFQDYKGRQQTPELSEQFPLLRELLKAYRI PAYELDHYEADDI IGTMAARAEREGF
 AVKVISGDRDLTQLASPOVTVEITKKGITDIESYTPETVVEKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDN
 I PGVPGIGEKTAVKLLKQFGTVENVLASIDEIKGEKLNENLRQYRDLALLSKQLAAICRDAPV
 ELTLDDIVYKGEDREKVVAFQELGFQSFQFLDKMAVQTDDEGEKPLAGMDFAIADSVTDEMLADK
 AALVVEVVDNYHHAPIVGIALANERGRFFLRPETALADPKFLAWLGDDETKKKTMTFDSKRAAV
 ALKWKGIELRGVVDLLLAAYLLDPAQAAGDVA AVAKMHQYEAVRSDEAVYKKGAKRTVPDEP
 TLAEHLARKAAAIWALEEPLMDELRRNEQDRLLTELEQPLAGILANMEFTGVKVDTKRLEQMG
 AELTEQLQAVERRIYELAGQEFNINSPKQLGTVLFDKQLPVLKKTGTGYSTSAADVLEKLAPH

HEIVEHILHYRQLGKLQSTYIEGLLKVVHPVTGKVHTMNFQALTQTGRLSSVEPNLQNIPIRL
 EEGRKIRQAFVPSEPDWLIFAADYSQIELRVLAHIAEDDNLIEAFRRGLDIHTKTAMDIFHVS
 EEDVTANMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLAQNLNITRKEAAEFIERYFASFPGVKQYMDNIVQE
 AKQKGYVTLLHRRRYLPDITSRNFNVRSAERTAMNTPIQGSAADI IKKAMIDL SVRLREER
 LQARLLLQVHDELILEAPKEEIERLCRLVPEVMEQAVALRVPLKVDYHYGPTWYDAK

SEC ID N°: 41 ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)

MKKKLVLIDGSSVAYRAFFALPLLHNDKGIHTNAVYGFMMNLNKILAE EEPHMLVAFDAGKT
 TFRHEAFQEYKGGROQTPPELSEQFPLRELLRAYRIPAYELENYEADDIIGTLAARAEQEGF
 EVKVISGDRDLTQLASPHVTVDITKKGITDIEPYTPEAVREKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDN
 I PGVPGIGEKTAVKLLRQFGTVENVLASIDEIKGEKLEKTLRQHREALLSKKLAAIRRDAPV
 ELSLDDIAYQGEDREKVVALFKELGFQSFLEKMESSSEEEKPLAKMAFTLADRVTEEMLADK
 AALVVEVVEENYHDAPIVGIAVVNEHGRFFLRPETALADPQFVAWLGDDETKKSMFDSKRAAV
 ALKWKGIELCGVSFDLLLAAYLLDPAQGVDDVAAAAMKQYEAVRPDEAVYKKGAKRAVPDEP
 VLAEHLVRKAAAIWALERPFLDELRRNEQDRLLVELEQPLSSILAEMEFAGVKVDTKRLEQMG
 EELAEQLRTVEQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFEKLQLPVLKKSKTGYSTSDVLEKLAPY
 HEIVENILQHYRQLGKLQSTYIEGLLKVVPRDTPKKVHTIFNQALTQTGRLSSTEPNLQNIPIR
 LEEGRKIRQAFVPSESDWLI FAADYSQIELRVLAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQV
 SEDEVTPNMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLAQNLNISRKEAAEFIERYFESFPGVKRYMENIVQ
 EAKQKGYVTLLHRRRYLPDITSRNFNVRSF AERMAMNTPIQGSAADI IKKAMIDLNARLKEE
 RLQARLLLQVHDELILEAPKEEMERLCRLVPEVMEQAVTLRVPLKVDYHYGSTWYDAK

SEC ID Nº: 42

A-G-X1-X2-F-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L en la que X1 es H, E o Q; X2 es P, T o E; X3 es N o H; X4 es L o I; X5 es N o R; X6 es cualquier aminoácido; X7 es R, P, o S; X8 es D, K o T; X9 es L o V; X10 es cualquier aminoácido; X11 es R, N, Y, T o V; X12 es V o I; X13 es cualquier aminoácido distinto de F o Y; X14 es D o E; y X15 es E o K.

SEC ID Nº: 43

A-G-X1-P-F-N-X4-N-X6-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L en la que X1 es H o E; X4 es L o I; X6 es cualquier aminoácido; X7 es R o P; X8 es D o K; X9 es L o V; X10 es cualquier aminoácido; X11 es R o N; X12 es V o I; X13 es cualquier aminoácido distinto de F; X14 es D o E; y X15 es E o K.

SEC ID Nº: 44

A-G-X1-P-F-N-X4-N-S-X7-X8-Q-X9-X10-R-X12-L-X13-X14-X15-L en la que X1 es H o E; X4 es L o I; X7 es R o P; X8 es D o K; X9 es L o V; X10 es E o S; X12 es V o I; X13 es cualquier aminoácido distinto de F; X14 es D o E; y X15 es E o K.

SEC ID Nº: 45

A-G-H-P-F-N-L-N-X6-R-D-Q-L-X10-R-V-L-X13-D-E-L en la que X6 es cualquier aminoácido; X10 es cualquier aminoácido; y X13 es cualquier aminoácido distinto de F.

SEC ID Nº: 46

A-G-H-P-F-N-L-N-X6-R-D-Q-L-X10-R-V-L-X13-D-E-L en la que X6 es cualquier aminoácido distinto de S; X10 es cualquier aminoácido distinto de E; y X13 es cualquier aminoácido distinto de F.

SEC ID Nº: 47

A-G-H-P-F-N-L-N-X6-R-D-Q-L-X10-R-V-L-X13-D-E-L en la que X6 es S, G, A, D, F, K, C, T o Y; X10 es E, S, Q, A, G, K, o R; y X13 es A, G, S, T, Y, D o K.

SEC ID Nº: 48

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X13-D-E-L en la que X13 es A, G, S, T, D, o K.

SEC ID Nº: 49

A-G-X1-X2-F-X3-X4-X5-S-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L, en la que X1 es H, E o Q; X2 es P, T o E; X3 es N o H; X4 es L o I; X5 es N o R; X7 es R, P o S; X8 es D, K o T; X9 es L o V; X10 es E, S, A o G; X11 es R, N, Y, T o V; X12 es V o I; X13 es G, A, L, M, W, P, S, T, R, K, C, N, Q, D, E, V, I o H; y X14 es D o E; y X15 es E o K.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH

<120> ADN polimerasas con diferenciación de desapareamientos 3' aumentada

<130> 26745 WO-HS

<140> Aún sin asignar

<141> Aún sin asignar

ES 2 536 252 T3

<150> US 61/356.292
 <157> 18-06-2010

5 <160> 49
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

10 <210> 1
 <211> 834
 <212> PRT
 <213> *Thermus sp.*

15 <220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus sp.* Z05 (Z05)

<400> 1

```

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1      5      10      15
Val Asp Gly His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
 20      25      30
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35      40      45
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
 50      55      60
Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
 65      70      75      80
Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
 85      90      95
Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu
 100     105
Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
 115     120
Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg
 130     135     140
Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu
 145     150     155     160
Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys
 165     170     175
Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp
 180     185     190
Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
 195     200     205
Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg
 210     215     220
Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp
 225     230     235     240
Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu
 245     250     255
Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
 260     265     270
Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
 275     280     285
Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro
 290     295     300
Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp
 305     310     315     320
    
```

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg
 325 330
 Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp
 355 360 365
 Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro
 370 375 380
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
 385 390 395 400
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln
 405 410 415
 Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
 420 425 430
 Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
 435 440 445
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu
 450 455 460
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
 485 490 495
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
 500 505 510
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 515 520 525
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
 530 535 540
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly
 545 550 555 560
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
 565 570 575
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu
 580 585 590
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
 595 600 605
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 610 615 620
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 625 630 635 640
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val
 645 650 655 660
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
 660 665 670
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 675 680 685
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 690 695 700
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
 705 710 715 720
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
 725 730 735
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
 740 745 750
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 755 760 765
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 770 775 780
 Val His Asp Glu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
 785 790 795 800
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
 805 810 815
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 820 825 830
 Lys Gly

<210> 2
 <211> 832
 <212> PRT
 <213> *Thermus aquaticus*

<220>

<223> ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

<400> 2

5

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15
Val Asp Gly His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60
Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80
Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95
Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110
Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125
Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140
Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160
Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
165 170 175
Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190
Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205
Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220
Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225 230 235 240
Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255
Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
260 265 270
Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
275 280 285
Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
290 295 300
Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
305 310 315 320
Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
325 330 335
Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
340 345 350
Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
355 360 365
Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
370 375 380
Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
385 390 395 400
Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
405 410 415
Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
420 425 430
Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
435 440 445
Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
450 455 460
Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Leu Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
 690 695 700
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Gly Tyr Val
 705 710 715 720
 Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
 725 730 735
 Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
 740 745 750 755
 Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
 760 765 770
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Gln Val His
 775 780 785
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 790 795 800
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 805 810 815 820
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 825 830

<210> 3
 <211> 830
 <212> PRT
 <213> *Thermus filiformis*

5

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)

10

<400> 3

Met Leu Pro Leu Leu Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly
 1 5 10 15
 His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr
 20 25 30
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu
 35 40 45
 Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala
 65 70 75 80
 Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile
 85 90 95
 Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly

			100					105				110			
Phe	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Arg	Lys	Ala	Glu	Arg
		115					120					125			
Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gln
	130					135					140				
Leu	Leu	Ser	Asp	Arg	Ile	His	Leu	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Glu	Val	Leu
145					150					155					160
Thr	Pro	Gly	Trp	Leu	Gln	Glu	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Glu	Arg	Trp
			165						170						175
Val	Glu	Tyr	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Gly
			180					185					190		
Val	Pro	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Trp
		195					200					205			
Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Lys	Pro	Glu
	210					215					220				
Arg	Val	Trp	Glu	Ala	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Gln	Met	Ser
225					230					235					240
Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Phe
				245					250					255	
Ala	Lys	Arg	Arg	Glu	Pro	Thr	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Ala	Phe	Leu	Glu
			260					265					270		
Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Glu	Ala
		275					280					285			
Pro	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Phe
	290					295					300				
Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp	Ala	Glu	Leu	Leu
305					310					315					320
Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Lys	Glu	Gly	Arg	Val	His	Arg	Ala	Glu	Asp	Pro
			325						330					335	
Val	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Arg	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
			340					345					350		
Asp	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Glu	Gly	Arg	Glu	Ile	Pro	Pro	Gly
		355					360					365			
Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Gly	Asn	Thr	Asn
	370					375					380				
Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp	Lys	Glu	Asp	Ala
385					390					395					400
Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	Trp	Gln	Ala	Leu	Tyr	Pro	
			405						410				415		
Arg	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	Arg	Glu	Val	Glu
			420					425					430		
Arg	Pro	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala	Thr	Gly	Val	Arg
		435					440					445			
Leu	Asp	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Glu	Val	Ala	Phe	Glu
	450					455					460				
Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Val	His	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Pro	Phe
465					470					475					480
Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Asp	Glu	Leu
			485						490					495	
Gly	Leu	Pro	Pro	Ile	Gly	Lys	Thr	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser	Thr
		500						505					510		
Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Val	Gly
		515					520					525			
Arg	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile
	530					535					540				
Asp	Pro	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	His	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Leu	His	Thr
545					550					555					560
Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
			565						570					575	
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Thr	Pro	Leu	Gly	Gln	Arg	Ile
			580					585					590		
Arg	Lys	Ala	Phe	Ile	Ala	Glu	Glu	Gly	His	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Asp
		595					600					605			
Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu
	610					615					620				
Asn	Leu	Ile	Arg	Val	Phe	Arg	Glu	Gly	Lys	Asp	Ile	His	Thr	Glu	Thr
625					630					635					640
Ala	Ala	Trp	Met	Phe	Gly	Val	Pro	Pro	Glu	Gly	Val	Asp	Gly	Ala	Met

				645					650				655		
Arg	Arg	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Met	Ser
			660					665					670		
Ala	His	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Ala
		675					680					685			
Ala	Phe	Ile	Glu	Arg	Tyr	Phe	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys	Val	Arg	Ala	Trp
	690					695					700				
Ile	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Glu	Thr
705				710						715					720
Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Val	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Arg	Val	Lys
				725					730					735	
Ser	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Met	Ala	Phe	Asn	Met	Pro	Val	Gln
			740					745					750		
Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Met	Val	Lys	Leu	Phe	Pro
		755					760					765			
Arg	Leu	Arg	Pro	Leu	Gly	Val	Arg	Ile	Leu	Leu	Gln	Val	His	Asp	Glu
	770					775					780				
Leu	Val	Leu	Glu	Ala	Pro	Lys	Ala	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Gln	Leu
785					790					795					800
Ala	Lys	Glu	Thr	Met	Glu	Gly	Val	Tyr	Pro	Leu	Ser	Val	Pro	Leu	Glu
				805					810					815	
Val	Glu	Val	Gly	Met	Gly	Glu	Asp	Trp	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu		
			820					825					830		

<210> 4
 <211> 831
 <212> PRT
 <213> *Thermus flavus*

5

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

10

<400> 4

Met	Ala	Met	Leu	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Val
1				5					10					15	
Asp	Gly	His	His	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu
			20					25					30		
Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Ala	Lys
		35					40					45			
Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Val
	50					55					60				
Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	His	Glu	Ala	Tyr	Glu	Ala	Tyr
65					70					75					80
Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln	Leu	Ala
				85					90					95	
Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Arg	Leu	Glu	Val
			100					105					110		
Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys	Arg	Ala
		115					120					125			
Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu
	130					135					140				
Tyr	Gln	Leu	Leu	Ser	Glu	Arg	Ile	Ala	Ile	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Tyr
145					150						155				160
Leu	Ile	Thr	Pro	Ala	Trp	Leu	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Glu
				165					170					175	
Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu	Ala	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp	Asn	Ile
			180					185						190	
Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Gln	Arg	Leu	Ile	Arg
		195					200					205			
Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	His	Leu	Asp	Gln	Val	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln	Ala	Gly	Met	Glu	Ala	Leu	Ala	Leu
225					230					235					240
Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Gln	Val	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp
				245					250					255	
Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	Phe	Leu
			260					265					270		

Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu
 275 280
 Gly Pro Lys Ala Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Gly Leu Gly Ala
 290 295 300
 Phe Leu Gly Phe Ser Phe Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu
 305 310 315 320
 Leu Ala Leu Ala Gly Ala Trp Glu Gly Arg Leu His Arg Ala Gln Asp
 325 330 335
 Pro Leu Arg Gly Leu Arg Asp Leu Lys Gly Val Arg Gly Ile Leu Ala
 340 345 350
 Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Phe Pro
 355 360 365
 Glu Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr
 370 375 380
 Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu Asp
 385 390 395 400
 Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Phe Gln Thr Leu Lys
 405 410 415
 Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Glu Glu Val
 420 425 430
 Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala Arg Met Glu Ala Thr Gly Val
 435 440 445
 Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Glu Ala
 450 455 460
 Glu Val Arg Gln Leu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro
 465 470 475 480
 Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu
 485 490 495
 Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser
 500 505 510
 Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val
 515 520 525
 Asp Arg Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr
 530 535 540
 Ile Asp Pro Leu Pro Ala Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His
 545 550 555 560
 Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser
 565 570 575
 Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg
 580 585 590
 Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu
 595 600 605
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
 610 615 620
 Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Gln
 625 630 635 640
 Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Gly Val Asp Pro Leu
 645 650 655
 Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met
 660 665 670
 Ser Ala His Arg Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala
 675 680 685
 Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Tyr Pro Lys Val Arg Ala
 690 695 700
 Trp Ile Glu Gly Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu
 705 710 715 720
 Thr Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val
 725 730 735
 Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val
 740 745 750
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe
 755 760 765
 Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp
 770 775 780
 Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala
 785 790 795 800
 Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu
 805 810 815

Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

5 <210> 5
 <211> 830
 <212> PRT
 <213> *Thermus sp.*

10 <220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus sp.* ps17 (Sps17)

<400> 5

Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly
 1 5 10 15
 His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr
 20 25 30
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu
 35 40 45
 Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Glu Val Ala Ile Val Val Phe Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr Lys Ala
 65 70 75 80
 Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala Leu Ile
 85 90 95
 Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val Pro Gly
 100 105 110
 Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Lys Ala Glu Arg
 115 120 125
 Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Ser Ala Asp Arg Asp Leu Tyr Gln
 130 135 140
 Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Leu Leu His Pro Glu Gly Glu Val Leu
 145 150 155 160
 Thr Pro Gly Trp Leu Gln Glu Arg Tyr Gly Leu Ser Pro Glu Arg Trp
 165 170 175
 Val Glu Tyr Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp Asn Leu Pro Gly
 180 185 190
 Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Trp
 195 200 205
 Gly Ser Leu Glu Ala Ile Leu Lys Asn Leu Asp Gln Val Lys Pro Glu
 210 215 220
 Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Asn Asn Leu Asp Lys Leu Gln Met Ser
 225 230 235 240
 Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp Phe
 245 250 255
 Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Trp Glu Gly Leu Lys Ala Phe Leu Glu
 260 265 270
 Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Glu Ala
 275 280 285
 Pro Lys Glu Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Gly Gly Ala Phe
 290 295 300
 Leu Gly Phe Leu Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Ala Leu Ala Gly Ala Lys Glu Gly Arg Val His Arg Ala Glu Asp Pro
 325 330 335
 Val Gly Ala Leu Lys Asp Leu Lys Glu Ile Arg Gly Leu Leu Ala Lys
 340 345 350
 Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Glu Ile Pro Pro Gly
 355 360 365
 Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Gly Asn Thr Asn
 370 375 380
 Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Lys Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 Ala Ala Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu Trp Gln Ala Leu Tyr Pro
 405 410 415
 Arg Val Ala Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu Val Glu
 420 425 430
 Arg Pro Leu Ala Gln Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly Val Arg

435
 Leu Asp Val Pro Tyr Leu Glu Ala Leu Ser Gln Glu Val Ala Phe Glu
 450
 Leu Glu Arg Leu Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe
 465
 Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu
 485
 Gly Leu Pro Pro Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser Thr
 500
 Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val Gly
 515
 Arg Ile Leu Glu Tyr Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
 530
 Asp Pro Leu Pro Arg Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His Thr
 545
 Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp
 565
 Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile
 580
 Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp
 595
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu
 610
 Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr
 625
 Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met
 645
 Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser
 660
 Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala
 675
 Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp
 690
 Ile Ala Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr
 705
 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys
 725
 Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln
 740
 Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro
 755
 Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Gln Val His Asp Glu
 770
 Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Gln Leu
 785
 Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ser Val Pro Leu Glu
 805
 Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Ala
 820
 825
 830

<210> 6
 <211> 834
 <212> PRT
 <213> *Thermus thermophilus*

5

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

10

<400> 6

Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
 20
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
 50
 55
 60

Val 65	Val	Phe	Asp	Ala	Lys 70	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg 75	His	Glu	Ala	Tyr	Glu 80
Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly 85	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg 95	Gln
Leu	Ala	Leu	Ile 100	Lys	Glu	Leu	Val	Asp 105	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr 110	Arg	Leu
Glu	Val	Pro 115	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp 120	Asp	Val	Leu	Ala	Thr 125	Leu	Ala	Lys
Lys 130	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr 135	Glu	Val	Arg	Ile	Leu 140	Thr	Ala	Asp	Arg
Asp 145	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val 150	Ser	Asp	Arg	Val	Ala 155	Val	Leu	His	Pro	Glu 160
Gly	His	Leu	Ile 165	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp 170	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Arg 175
Pro	Glu	Gln	Trp 180	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu 185	Val	Gly	Asp	Pro 190	Ser	Asp
Asn	Leu	Pro 195	Gly	Val	Lys	Gly	Ile 200	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala 205	Leu	Lys	Leu
Leu	Lys 210	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu 215	Asn	Leu	Leu	Lys 220	Asn	Leu	Asp	Arg
Val 225	Lys	Pro	Glu	Asn	Val 230	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys 235	Ala	His	Leu	Glu	Asp 240
Leu	Arg	Leu	Ser 245	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val 250	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro 255	Leu
Glu	Val	Asp	Leu 260	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu 265	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly 270	Leu	Arg
Ala	Phe 275	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe 280	Gly	Ser	Leu	Leu	His 285	Glu	Phe	Gly
Leu	Leu 290	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro 295	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro 300	Trp	Pro	Pro	Pro
Glu 305	Gly	Ala	Phe	Val	Gly 310	Phe	Val	Leu	Ser	Arg 315	Pro	Glu	Pro	Met	Trp 320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala 325	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg 330	Asp	Gly	Arg	Val	His 335	Arg
Ala	Ala	Asp	Pro 340	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys 345	Asp	Leu	Lys	Glu	Val 350	Arg	Gly
Leu	Leu 355	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Val 360	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu 365	Gly	Leu	Asp
Leu 370	Val	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro 375	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr 380	Leu	Leu	Asp	Pro
Ser 385	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu 390	Gly	Val	Ala	Arg	Arg 395	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp 400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala 405	His	Arg	Ala	Leu	Leu 410	Ser	Glu	Arg	Leu	His 415	Arg
Asn	Leu	Leu	Lys 420	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu 425	Glu	Lys	Leu	Leu	Trp 430	Leu	Tyr
His	Glu	Val 435	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser 440	Arg	Val	Leu	Ala	His 445	Met	Glu	Ala
Thr	Gly	Val 450	Arg	Arg	Asp	Val 455	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala 460	Leu	Ser	Leu	Glu
Leu 465	Ala	Glu	Glu	Ile 470	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu 475	Val	Phe	Arg	Leu	Ala 480
Gly	His	Pro	Phe	Asn 485	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp 490	Gln	Leu	Glu	Arg	Val 495	Leu
Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu 505	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys 510	Thr	Gly
Lys	Arg	Ser 515	Thr	Ser	Ala	Ala	Val 520	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg 525	Glu	Ala	His
Pro	Ile 530	Val	Glu	Lys	Ile	Leu	Gln 535	His	Arg	Glu	Leu 540	Thr	Lys	Leu	Lys
Asn 545	Thr	Tyr	Val	Asp	Pro 550	Leu	Pro	Ser	Leu	Val 555	His	Pro	Arg	Thr	Gly 560
Arg	Leu	His	Thr	Arg 565	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala 570	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg 575	Leu
Ser	Ser	Ser	Asp 580	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn 585	Ile	Pro	Val	Arg	Thr 590	Pro	Leu
Gly	Gln	Arg 595	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe 600	Val	Ala	Glu	Ala	Gly 605	Trp	Ala	Leu

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 610 615
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 625 630 635 640
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val
 645 650 655
 Asp Pro Leu Met Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
 660 665 670
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 675 680 685
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 690 695 700
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
 705 710 715 720
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
 725 730 735
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
 740 745 750
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 755 760 765
 Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 770 775 780
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
 785 790 795 800
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
 805 810 815
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 820 825 830
 Lys Gly

<210> 7
 <211> 834
 <212> PRT
 <213> *Thermus caldophilus*

5

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

10

<400> 7

Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
 20 25 30
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
 50 55 60
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
 65 70 75 80
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
 85 90 95
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu
 100 105 110
 Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
 115 120 125
 Asn Pro Gln Lys Gln Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg
 130 135 140
 Asp Leu Asp Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Gln Lys Tyr Gly Leu Lys
 165 170 175
 Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp
 180 185 190
 Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
 195 200 205
 Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp
 225 230 235 240
 Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu
 245 250 255
 Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
 260 265 270
 Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
 275 280 285
 Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro
 290 295 300
 Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp
 305 310 315 320
 Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg
 325 330 335
 Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp
 355 360 365
 Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Tyr Gly Gly Glu Trp
 370 375 380 385
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
 385 390 395 400
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg
 405 410 415
 Asn Leu Leu Lys Arg Leu Gln Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
 420 425 430
 His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
 435 440 445
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu
 450 455 460
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
 485 490 495
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
 500 505 510
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 515 520 525
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
 530 535 540
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Asn Thr Gly
 545 550 555 560
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
 565 570 575
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu
 580 585 590
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
 595 600 605
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 610 615 620
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 625 630 635 640
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val
 645 650 655
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
 660 665 670
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 675 680 685
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 690 695 700
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
 705 710 715 720
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
 725 730 735
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
 740 745 750
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 755 760 765

Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 770 775
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Gly Ala Glu Glu
 785 790 795
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
 805 810
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Glu Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 820 825 830
 Lys Gly

5 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = His, Glu o Gln

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Pro, Thr o Glu

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Asn o His

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Leu o Ile

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Asn o Arg

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Arg, Pro o Ser

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp, Lys o Thr

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Leu o Val

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Glu, Ser, Ala o Gly

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Arg, Asn, Tyr, Thr o Val

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe o Tyr

15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Asp o Glu

20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = Glu o Lys

25
 <400> 8

Ala	Gly	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10						15	
Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Leu											
			20												

30
 <210> 9
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = His o Glu

45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Leu o Ile

50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Arg o Pro

55
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp o Lys

60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Leu o Val

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Glu o ser

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Arg o Asn

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Asp o Glu

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = Glu o Lys

30 <400> 9
 Ala Gly Xaa Pro Phe Asn Xaa Asn Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Leu Xaa Xaa Xaa Leu
 20

35 <210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe

<400> 10
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

50 <210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

<220>
 <221> VARIANTE

ES 2 536 252 T3

<222> (18)...(18)

<223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asp o Lys

<400> 11

5

Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

<210> 12

<211> 36

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus* sp. Z05 (Z05)

15

<400> 12

Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala
 20 25 30
 Leu Gly Lys Thr
 35

20

<210> 13

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

<400> 13

Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala
 20 25 30
 Ile Gly Lys Thr
 35

30

<210> 14

<211> 36

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)

40

<400> 14

Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Gly Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ile Gly Lys Thr
 35

45

<210> 15

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 536 252 T3

<220>

<223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

5 <400> 15

Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala
20 25 30
Ile Gly Lys Thr
35

<210> 16

10 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus sp.* Sps17 (Sps17)

<400> 16

Glu Ala Glu Val His Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
1 5 10 15
Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Gly Leu Pro Pro
20 25 30
Ile Gly Lys Thr
35

20 <210> 17

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

<400> 17

30 <210> 18

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

<400> 18

Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
1 5 10 15
Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala
20 25 30
Leu Gly Lys Thr
35

40 <210> 18

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

<400> 18

Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser
1 5 10 15
Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala
20 25 30
Leu Gly Lys Thr
35

ES 2 536 252 T3

5 <210> 19
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)

10 <400> 19

```

Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe Asn Ile Asn Ser
 1      5      10      15
Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu Gly Ile Lys Pro
 20      25      30
Arg Gly Lys Thr
      35
  
```

15 <210> 20
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

<400> 20

```

Ala Glu Lys Ile Tyr Gln Ile Ala Gly Glu Pro Phe Asn Ile Asn Ser
 1      5      10      15
Pro Lys Gln Val Ser Asn Ile Leu Phe Glu Lys Leu Gly Ile Lys Pro
 20      25      30
Arg Gly Lys Thr
      35
  
```

25 <210> 21
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

<400> 21

```

Lys Glu Lys Val Phe Glu Ile Ala Gly Glu Thr Phe Asn Leu Asn Ser
 1      5      10      15
Ser Thr Gln Val Ala Tyr Ile Leu Phe Glu Lys Leu Asn Ile Ala Pro
 20      25      30
Tyr Lys Lys
      35
  
```

35 <210> 22

40 <400> 22
 000

45 <210> 23
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

50 <400> 23

ES 2 536 252 T3

Glu Ser Gln Ile His Glu Tyr Ala Gly Glu Glu Phe His Ile Arg Ser
 1 5 10 15
 Pro Lys Gln Leu Glu Thr Val Leu Tyr Asp Lys Leu Glu Leu Ala Ser
 20 25 30
 Ser Lys Lys Thr
 35

- 5 <210> 24
- <211> 36
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)
- <400> 24

Glu Arg Arg Ile Tyr Glu Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ile Asn Ser
 1 5 10 15
 Pro Lys Gln Leu Gly Thr Val Leu Phe Asp Lys Leu Gln Leu Pro Val
 20 25 30
 Leu Lys Lys Thr
 35

- 15 <210> 25
- <211> 36
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> región sintética del dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)
- <400> 25

Glu Gln Arg Ile Tyr Glu Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ile Asn Ser
 1 5 10 15
 Pro Lys Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu Lys Leu Gln Leu Pro Val
 20 25 30
 Leu Lys Lys Ser
 35

- 30 <210> 26
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> motivo consenso nativo sintético para región del dominio de polimerasa de ADN polimerasa bacteriana

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (3)...(3)
- 40 <223> Xaa = His, Glu o Gln

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)...(4)
- 45 <223> Xaa = Pro, Thr o Glu

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (6)...(6)

<223> Xaa = Asn o His
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Leu o Ile
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Asn o Arg
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Arg, Pro o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp, Lys o Thr
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Leu o Val
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Glu, Ser, Ala o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Arg, Asn, Tyr, Thr o Val
 <220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile
 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Phe o Tyr
 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Asp o Glu
 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = Glu o Lys
 <400> 26

Ala Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Leu Xaa Xaa Xaa Leu
 20

<210> 27

ES 2 536 252 T3

<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> motivo de polimerasa sintético correspondiente a la mutación D580X de Z05, motivo D580 Z05 modificado

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Ser o Thr

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Asp o Glu

<400> 27

20 **Thr Gly Arg Leu Ser Ser Xaa Xaa Pro Asn Leu Gln Asn**
1 5 10

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo de sitio activo de ADN polimerasa conservado sintético A

30 <400> 28

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg
1 5

35 <210> 29
<211> 893
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> ADN polimerasa CS6 química sintética derivada del dominio de nucleasa 5' N-terminal de *Thermus* sp. Z05 y los dominios de exonucleasa 3'-5' C-terminal y polimerasa de ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*

<400> 29

ES 2 536 252 T3

Met 1	Lys	Ala	Met	Leu 5	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro 10	Lys	Gly	Arg	Val	Leu 15	Leu
Val	Asp	Gly	His 20	His	Leu	Ala	Tyr	Arg 25	Thr	Phe	Phe	Ala	Leu 30	Lys	Gly
Leu	Thr	Thr 35	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro 40	Val	Gln	Ala	Val	Tyr 45	Gly	Phe	Ala
Lys	Ser 50	Leu	Leu	Lys	Ala 55	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Tyr 60	Lys	Ala	Val	Phe
Val 65	Val	Phe	Asp	Ala 70	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg 75	His	Glu	Ala	Tyr	Glu 80
Ala	Tyr	Lys	Ala 85	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro 90	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg 95	Gln
Leu	Ala	Leu	Ile 100	Lys	Glu	Leu	Val	Asp 105	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr 110	Arg	Leu
Glu	Val	Pro 115	Gly	Phe	Glu	Ala	Asp 120	Asp	Val	Leu	Ala	Thr 125	Leu	Ala	Lys
Lys	Ala 130	Glu	Arg	Glu	Gly 135	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu 140	Thr	Ala	Asp	Arg
Asp 145	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val 150	Ser	Asp	Arg	Val	Ala 155	Val	Leu	His	Pro	Glu 160
Gly	His	Leu	Ile 165	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp 170	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu 175	Lys
Pro	Glu	Gln 180	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala 185	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
Asn	Leu 195	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile 200	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala 205	Leu	Lys	Leu
Leu	Lys 210	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu 215	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys 220	Asn	Leu	Asp	Arg
Val 225	Lys	Pro	Glu	Ser 230	Val	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys 235	Ala	His	Leu	Glu	Asp 240

Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu
 245 255
 Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
 260 265 270
 Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
 275 280 285
 Leu Leu Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu
 290 295 300
 Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile
 325 330 335
 Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro
 340 345 350
 Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys
 355 360 365
 Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln
 370 375 380
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro
 385 390 395 400
 Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro
 405 410 415
 Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly
 420 425 430 435
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu
 435 440 445
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr
 450 455 460
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu
 485 490 495
 Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr
 500 505 510
 Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys
 515 520 525
 Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe
 530 535 540
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu
 545 550 555 560
 Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr
 565 570 575
 Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro
 580 585 590
 Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
 595 600 605
 Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala
 610 615 620
 Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp
 625 630 635 640
 Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile
 645 650 655
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala
 660 665 670
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
 675 680 685
 Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu
 690 695 700
 Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu
 705 710 715 720
 Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val
 725 730 735
 Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala
 740 745 750
 Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp
 755 760 765
 Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
 770 775 780

ES 2 536 252 T3

Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp
 785 790 800
 Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile
 805 810 815
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp
 820 825 830
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val
 835 840 845
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu
 850 855 860
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
 865 870 875 880
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser
 885 890

<210> 30
 <211> 893
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN polimerasa CS6 quimérica sintética derivada del dominio de nucleasa 5' N-terminal de *Thermus* sp.
 10 Z05 y los dominios de exonucleasa 3'-5' C-terminal y polimerasa de ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*

<400> 30

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
 20 25 30
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
 50 55 60
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
 65 70 75 80
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
 85 90 95
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu
 100 105 110
 Glu Val Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
 115 120 125
 Lys Ala Glu Arg Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg
 130 135 140
 Asp Leu Tyr Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Lys
 165 170 175
 Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp
 180 185 190
 Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
 195 200 205
 Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Ile Leu Lys Asn Leu Asp Arg
 210 215 220
 Val Lys Pro Glu Ser Val Arg Glu Arg Ile Lys Ala His Leu Glu Asp
 225 230 235 240
 Leu Lys Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Ser Asp Leu Pro Leu
 245 250 255
 Glu Val Asp Phe Ala Arg Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
 260 265 270
 Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
 275 280 285
 Leu Leu Glu Glu Ser Glu Pro Val Gly Tyr Arg Ile Val Lys Asp Leu
 290 295 300
 Val Glu Phe Glu Lys Leu Ile Glu Lys Leu Arg Glu Ser Pro Ser Phe
 305 310 315 320

Ala Ile Ala Leu Ala Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asp Cys Asp Ile
 Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Glu Ala Tyr Tyr Ile Pro
 Leu His His Arg Asn Ala Gln Asn Leu Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys
 Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Gly Ala Lys Ile Val Gly Gln
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Val Glu Pro
 Val Pro Pro Tyr Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro
 Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala Leu Lys Phe Leu Gly
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser
 Leu Lys Leu His Glu Ala Asp Leu Glu Asn Val Phe Tyr Lys Ile Glu
 Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr
 Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys
 Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu
 Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr
 Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro
 Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
 Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala
 Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp
 Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
 Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu
 Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu
 Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val
 Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala
 Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp
 Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
 Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp
 Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu

Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
 865 870 875 880
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser
 885 890

<210> 31
 <211> 21
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador directo de amplificación por PCR propensa a error (mutagénica) sintético

10 <400> 31
 ctacctcctg gaccctcca a 21

15 <210> 32
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador inverso de amplificación por PCR propensa a error (mutagénica) sintético

<400> 32
 ataaccaact ggtagtggcg tgtaa 25

25 <210> 33
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> amplicón sintético que codifica el dominio de polimerasa de ADN polimerasa Z05 D580G amplificada por PCR propensa a error (mutagénica) entre los sitios de restricción BlnI y BglII

35 <400> 33

ctacctcctg	gaccctcca	acaccacccc	cgagggggg	gcccggcgct	acggggggga	60
gtggacggag	gacgcccgcc	accgggcccc	cctcgctgag	cggtccagc	aaaacctctt	120
ggaacgcctc	aagggagagg	aaaagctcct	ttggctctac	caagaggtgg	aaaagcccct	180
ctcccgggtc	ctggcccaca	tggaggccac	cggggtaagg	ctggacgtgg	cctatctaaa	240
ggcccttcc	ctggagcttg	cgaggagat	tcgcccctc	gaggaggagg	tcttccgctt	300
ggcggggcac	cccttcaacc	tgaactcccg	tgaccagcta	gagcgggtgc	tctttgacga	360
gcttaggctt	cccgccctgg	gcaagacgca	aaagacgggg	aagcgctcca	ccagcgcgc	420
ggtgctggag	gccctcaggg	aggccacccc	catcgtggag	aagatcctcc	agcaccggga	480
gctcaccaag	ctcaagaaca	cctacgtaga	ccccctcccg	ggcctcgtcc	acccgaggac	540
gggcccctc	cacacccgct	tcaaccagac	agccacggcc	acgggaaggc	tctctagctc	600
cgggcccaac	ctgcagaaca	tccccatccg	cacccccttg	ggccagagga	tccgcccggc	660
cttctgtggc	gaggcgggat	gggcgttggg	ggccctggac	tatagccaga	tagagctccg	720
ggtcctcgcc	cacctctccg	gggacgagaa	cctgatcagg	gtcttccagg	aggggaagga	780
catccacacc	cagaccgcaa	gctggatggt	cggcgtctcc	ccggaggccg	tggaccccct	840
gatgcgcccg	gcggccaaga	cggtgaaact	cggcgtctcc	tacggcatgt	ccgccatag	900
gctctcccag	gagcttgcca	tcccctacga	ggaggcgggtg	gcctttatag	agcgtactt	960
ccaaagcttc	ccaaaggtgc	ggcctggat	agaaaagacc	ctggaggagg	ggaggaagcg	1020
gggtacgtg	gaaaacctct	tcggaagaag	gcgtacgtg	cccgacctca	acgcccgggt	1080
gaagagcgtc	agggaggccg	cgagcgcgt	ggccttcaac	atgcccgtcc	agggcaccgc	1140
cgccgacctc	atgaagctcg	ccatggtgaa	gctcttcccc	cacctccggg	agatgggggc	1200
ccgcatgctc	ctccaggtcc	acgacgagct	cctcctggag	gccccccaag	cgcgggccga	1260
ggaggtggcg	gctttggcca	aggaggccat	ggagaaggcc	tatccccctg	ccgtgcccct	1320
ggaggtggag	gtggggatcg	gggaggactg	gctttccgcc	aagggtgat	atcagatctc	1380
cctgattatg	cgtcagtcta	tgaagaaaaa	tcgtatacag	atggacgaag	agagaatctc	1440
tgtgaattta	acagagggta	tagggattac	acgccactac	cagttggtta	t	1491

<210> 34
 <211> 110

ES 2 536 252 T3

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> polinucleótido diana BRAF V600K de tipo silvestre sintético

<400> 34

agtaaaaata ggtgattttg gtctagctac agtgaaatct cgatggagtg ggtcccatca 60
gtttgaacag ttgtctggat ccattttgtg gatggtaaga attgaggcta 110

10 <210> 35
<211> 110
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> polinucleótido diana BRAF V600R mutante sintético

20 <400> 35

agtaaaaata ggtgattttg gtctagctac aaggaaatct cgatggagtg ggtcccatca 60
gtttgaacag ttgtctggat ccattttgtg gatggtaaga attgaggcta 110

25 <210> 36
<211> 921
<212> PRT
<213> *Deinococcus radiodurans*

30 <220>
<223> ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

<400> 36

ES 2 536 252 T3

Met	Ala	Asp	Ala	Ser	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Pro	Asp	Ala	Leu	Val	Leu
1				5					10					15	
Ile	Asp	Gly	His	Ala	Leu	Ala	Phe	Arg	Ser	Tyr	Phe	Ala	Leu	Pro	Pro
			20					25					30		
Leu	Asn	Asn	Ser	Lys	Gly	Glu	Met	Thr	Asp	Ala	Ile	Val	Gly	Phe	Met
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Arg	Gln	Lys	Ser	Asn	Gln	Val	Ile	Val
	50					55					60				
Val	Phe	Asp	Pro	Pro	Val	Lys	Thr	Leu	Arg	His	Glu	Gln	Tyr	Glu	Gly
	65				70					75				80	
Tyr	Lys	Ser	Gly	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Arg	Gly	Gln	Ile
				85					90					95	
Asn	Arg	Ile	Arg	Ala	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu
			100					105					110		
Glu	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Arg	Met
		115					120					125			
Ala	Glu	Gly	Lys	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Val	Thr	Ser	Asp	Arg	Asp
	130					135					140				
Ala	Tyr	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	His	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Asn	Asp	Phe
	145				150					155					160
Ser	Leu	Ile	Gly	Pro	Ala	Gln	Val	Glu	Glu	Lys	Tyr	Gly	Val	Thr	Val
				165					170					175	
Arg	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Ser	Asp	Asn
			180					185						190	
Ile	Pro	Gly	Ala	Lys	Gly	Ile	Gly	Pro	Lys	Thr	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu
		195					200					205			
Gln	Glu	Tyr	Gly	Thr	Leu	Glu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	His	Ala	Gly
	210					215					220				
Thr	Leu	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu
	225				230					235					240
Asn	Val	Lys	Phe	Ser	His	Asp	Leu	Ser	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Leu	Pro
				245					250					255	
Leu	Asp	Ile	Glu	Phe	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Pro	Asp	Asn	Pro	Leu	Val
			260					265					270		
Thr	Glu	Asp	Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	His	Ser	Leu	Arg	Pro	Met

Ile	Leu	275	Gly	Leu	Asn	Gly	Pro	280	Glu	Gln	Asp	Gly	His	285	Ala	Pro	Asp	Asp
Leu	Leu	290	Glu	Arg	Glu	His	Ala	295	Gln	Thr	Pro	Glu	Glu	300	Asp	Glu	Ala	Ala
305	Ala	Leu	Pro	Ala	Phe	310	Ser	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Glu	315	Trp	Gln	Thr	Pro
Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Trp	325	Gly	Tyr	Val	Leu	Ser	Arg	Glu	330	Asp	Asp	Leu	
Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	340	Thr	Phe	Glu	Asp	Gly	345	Val	Ala	Arg	
Pro	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Pro	Ala	355	Glu	Trp	Ala	Gln	Ala	360	Glu	Ala	Pro	
Glu	Asn	Leu	Phe	Gly	Glu	Leu	Leu	370	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	375	Leu	Thr	Lys	
385	Lys	Glu	Gln	Lys	Ala	Leu	Glu	380	Lys	Ala	Gln	Lys	Asp	385	Ala	Glu	Lys	Ala
Arg	Ala	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Phe	390	Pro	Ala	Thr	Val	Asp	395	Glu	Ala	Glu	
Phe	Val	Gly	Gln	Arg	Thr	Val	Thr	405	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	410	Ala	Leu	Ala	
Ala	His	Leu	Ser	Val	Arg	Gly	Thr	420	Val	Val	Glu	Pro	Gly	425	Asp	Asp	Pro	
Leu	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	435	Pro	Ala	Asn	Thr	Asn	440	Met	Pro	Val	
465	Val	Ala	Lys	Arg	Tyr	Leu	Asp	445	Arg	Glu	Trp	Pro	Ala	450	Asp	Ala	Pro	Thr
Arg	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	His	Leu	455	Val	Arg	Glu	Leu	Pro	460	Pro	Pro	Leu	Leu
Asp	Asp	Ala	Arg	Arg	Lys	Met	Tyr	470	Asp	Glu	Met	Glu	Lys	475	Pro	Leu	Ser	
Gly	Val	Leu	Gly	Arg	Met	Glu	Val	485	Arg	Gly	Val	Gln	Val	490	Asp	Ser	Asp	
Phe	Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Gln	500	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	505	Ala	Asp	Leu	Ser
545	Glu	Ser	Gln	Ile	His	Glu	Tyr	510	Ala	Gly	Glu	Glu	Phe	515	His	Ile	Arg	Ser
Pro	Lys	Gln	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	520	Tyr	Asp	Lys	Leu	Glu	525	Leu	Ala	Ser	
Ser	Lys	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	Gly	530	Gln	Arg	Ser	Thr	Ala	535	Val	Ser	Ala	
Leu	Glu	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	His	540	Pro	Ile	Ile	Pro	Leu	545	Val	Leu	Glu	
Phe	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	550	Ile	Ile	Pro	Leu	Val	555	Leu	Glu		
625	Asn	Leu	Val	Asn	Pro	His	Thr	560	Gly	Arg	Leu	His	Thr	565	Thr	Phe	Ala	Gln
Thr	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	570	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	575	Asn	Leu	Gln	
Asn	Ile	Pro	Ile	Arg	Ser	Glu	Leu	580	Gly	Arg	Glu	Ile	Arg	585	Lys	Gly	Phe	
Ile	Ala	Glu	Asp	Gly	Phe	Thr	Leu	590	Ile	Ala	Ala	Asp	Tyr	595	Ser	Gln	Ile	
Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ala	His	Ile	600	Ala	Asp	Asp	Pro	Leu	605	Met	Gln	Gln	
705	Ala	Phe	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	610	Ile	His	Arg	Thr	Ala	615	Ala	Gln	Val	
Leu	Gly	Leu	Asp	Glu	Ala	Thr	Val	620	Asp	Ala	Asn	Gln	Arg	625	Arg	Ala	Ala	
Lys	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Val	Leu	630	Tyr	Gly	Met	Ser	Ala	635	His	Arg	Leu	
Ser	Asn	Asp	Leu	Gly	Ile	Pro	Tyr	640	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	645	Phe	Ile	Glu	
Ile	Tyr	Phe	Ala	Thr	Tyr	Pro	Gly	650	Ile	Arg	Arg	Tyr	Ile	655	Asn	His	Thr	
785	Leu	Asp	Phe	Gly	Arg	His	Gly	660	Tyr	Val	Glu	Thr	Leu	665	Tyr	Gly	Arg	
Arg	Arg	Tyr	Val	Pro	Gly	Leu	Ser	670	Ser	Arg	Asn	Arg	Val	675	Gln	Arg	Glu	

ES 2 536 252 T3

			820					825				830			
Ala	Glu	Glu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Asn	Met	Pro	Ile	Gln	Gly	Thr	Ala	Ala
		835					840					845			
Asp	Ile	Met	Lys	Leu	Ala	Met	Val	Gln	Leu	Asp	Pro	Gln	Leu	Asp	Ala
	850					855					860				
Ile	Gly	Ala	Arg	Met	Leu	Leu	Gln	Val	His	Asp	Glu	Leu	Leu	Ile	Glu
865					870					875					880
Ala	Pro	Leu	Asp	Lys	Ala	Glu	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Lys	Lys	Val
				885					890					895	
Met	Glu	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Lys	Val	Pro	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Gly
			900					905					910		
Thr	Gly	Pro	Asn	Trp	Phe	Asp	Thr	Lys							
		915					920								

<210> 37
 <211> 892
 <212> PRT
 <213> *Thermosipho africanus*

5

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

10

<400> 37

Met	Gly	Lys	Met	Phe	Leu	Phe	Asp	Gly	Thr	Gly	Leu	Val	Tyr	Arg	Ala
1				5					10					15	
Phe	Tyr	Ala	Ile	Asp	Gln	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	His	Thr
			20					25					30		
Asn	Ala	Val	Tyr	Gly	Leu	Thr	Lys	Met	Leu	Ile	Lys	Phe	Leu	Lys	Glu
		35					40					45			
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Lys	Asp	Ala	Cys	Val	Phe	Val	Leu	Asp	Ser	Lys
	50					55				60					
Gly	Gly	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Asp	Ile	Leu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Ala	Asn
65					70					75					80
Arg	Pro	Ser	Thr	Pro	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Pro	Tyr	Val	Glu
				85					90					95	
Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Lys	Ile	Glu	Gly	Phe
			100					105					110		
Glu	Ala	Asp	Asp	Ile	Ile	Ala	Thr	Leu	Ser	Lys	Lys	Phe	Glu	Ser	Asp
		115					120					125			
Phe	Glu	Lys	Val	Asn	Ile	Ile	Thr	Gly	Asp	Lys	Asp	Leu	Leu	Gln	Leu
	130					135				140					
Val	Ser	Asp	Lys	Val	Phe	Val	Trp	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Ile	Thr	Asp
145					150					155					160
Leu	Val	Leu	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Val	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr
				165					170					175	
Pro	Glu	Gln	Phe	Lys	Asp	Tyr	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Asp	Gln	Ile	Asp
			180					185					190		
Asn	Ile	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Val	Ser	Leu
		195					200					205			
Leu	Lys	Lys	Tyr	Asn	Ser	Leu	Glu	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	Ile	Asn	Leu
		210					215					220			
Leu	Thr	Glu	Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp	Leu
225					230					235					240
Gln	Lys	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Glu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Val	Pro	Met	Asp
				245					250					255	
Val	Glu	Lys	Asp	Glu	Ile	Ile	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Asn	Pro	Asp	Lys	Leu
			260					265					270		
Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Glu	Phe	Ser	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Leu
		275					280					285			
Asn	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Tyr	Ile	Leu	Val	Asp	Asn	Glu
	290					295					300				
Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Lys	Thr	Phe
305					310					315					320
Ser	Ile	Asp	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Glu	Ala	Lys	Leu
				325					330					335	
Val	Gly	Ile	Ser	Ile	Ser	Thr	Met	Glu	Gly	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro
			340					345						350	

Val Ser His Phe Gly Ala Lys Asn Ile Ser Lys Ser Leu Ile Asp Lys
 Phe Leu Lys Gln Ile Leu Gln Glu Lys Asp Tyr Asn Ile Val Gly Gln
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Glu Ile Phe Lys Ser Met Gly Phe Ser Pro
 385 Asn Val Pro His Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Asn Pro
 Asp Glu Lys Arg Phe Asn Leu Glu Glu Leu Ser Leu Lys Tyr Leu Gly
 Tyr Lys Met Ile Ser Phe Asp Glu Leu Val Asn Glu Asn Val Pro Leu
 Phe Gly Asn Asp Phe Ser Tyr Val Pro Leu Glu Arg Ala Val Glu Tyr
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Val Thr Tyr Arg Ile Phe Arg Lys Leu Gly
 465 Arg Lys Ile Tyr Glu Asn Glu Met Glu Lys Leu Phe Tyr Glu Ile Glu
 Met Pro Leu Ile Asp Val Leu Ser Glu Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr
 Phe Asp Glu Glu Tyr Leu Lys Glu Leu Ser Lys Lys Tyr Gln Glu Lys
 Met Asp Gly Ile Lys Glu Lys Val Phe Glu Ile Ala Gly Glu Thr Phe
 Asn Leu Asn Ser Ser Thr Gln Val Ala Tyr Ile Leu Phe Glu Lys Leu
 545 Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Lys Thr Ala Thr Gly Lys Phe Ser Thr Asn
 Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu Ser Lys Glu His Glu Ile Ala Lys Leu
 Leu Leu Glu Tyr Arg Lys Tyr Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp
 Ser Ile Pro Leu Ser Ile Asn Arg Lys Thr Asn Arg Val His Thr Thr
 Phe His Gln Thr Gly Thr Ser Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asn Pro
 625 Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Arg Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile Arg
 Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Leu Gly Ala Asp
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Val Ser Lys Asp Glu
 Asn Leu Leu Lys Ala Phe Lys Glu Asp Leu Asp Ile His Thr Ile Thr
 Ala Ala Lys Ile Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Gln Met
 705 Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ala Ile Ile Tyr Gly Val Ser
 Pro Tyr Gly Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu Thr Lys
 Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr
 Leu Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr
 770 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Leu Arg Ser Lys Asn Gly
 785 Asn Arg Val Gln Glu Gly Glu Arg Ile Ala Val Asn Thr Pro Ile Gln
 Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ile Ala Met Ile Asn Ile His Asn
 Arg Leu Lys Lys Glu Asn Leu Arg Ser Lys Met Ile Leu Gln Val His
 835 Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Asn Glu Leu Glu Ile Val Lys
 Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro
 865 Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu
 885

ES 2 536 252 T3

<212> PRT

<213> *Thermotoga maritima*

<220>

5 <223> ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)

<400> 38

Met	Ala	Arg	Leu	Phe	Leu	Phe	Asp	Gly	Thr	Ala	Leu	Ala	Tyr	Arg	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Pro	Thr
			20					25					30		
Asn	Ala	Thr	Tyr	Gly	Val	Ala	Arg	Met	Leu	Val	Arg	Phe	Ile	Lys	Asp
		35					40					45			
His	Ile	Ile	Val	Gly	Lys	Asp	Tyr	Val	Ala	Val	Ala	Phe	Asp	Lys	Lys
	50					55					60				
Ala	Ala	Thr	Phe	Arg	His	Lys	Leu	Leu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Ala	Gln	Arg
65					70					75					80
Pro	Lys	Thr	Pro	Asp	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Leu	Pro	Tyr	Ile	Lys	Lys
				85					90					95	
Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Gly	Met	Lys	Val	Leu	Glu	Val	Glu	Gly	Tyr	Glu
			100					105					110		
Ala	Asp	Asp	Ile	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu	Phe
		115					120					125			
Asp	Glu	Ile	Phe	Ile	Val	Thr	Gly	Asp	Lys	Asp	Met	Leu	Gln	Leu	Val
	130					135					140				
Asn	Glu	Lys	Ile	Lys	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Lys	Gly	Ile	Ser	Asp	Leu
145					150					155					160
Glu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Gln	Lys	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu	Pro
				165					170					175	
Gln	Gln	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Glu	Ile	Asp	Asn
			180					185					190		
Ile	Pro	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Gln	Leu	Leu
		195					200					205			
Glu	Lys	Tyr	Lys	Asp	Leu	Glu	Asp	Ile	Leu	Asn	His	Val	Arg	Glu	Leu
	210					215					220				
Pro	Gln	Lys	Val	Arg	Lys	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Arg	Glu	Asn	Ala	Ile
225					230					235					240
Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Glu	Thr	Asn	Val	Pro	Ile	Glu	Ile
				245					250					255	
Asn	Trp	Glu	Glu	Leu	Arg	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Leu
		260						265					270		
Pro	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Phe	Ala	Ser	Ile	Met	Lys	Glu	Leu	Gln
		275					280					285			
Leu	Tyr	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	Asp	Leu
	290					295					300				
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe
305					310					315					320
Ala	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asp	Cys	Asp	Ile
				325					330					335	
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro
			340					345					350		
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Lys
		355					360					365			
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Val	Gly	Gln
	370					375					380				
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Pro
385					390					395					400
Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Pro
				405					410					415	
Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly
			420					425					430		
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Pro	Leu
		435					440					445			
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Ala	Asn	Tyr

	450				455					460					
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser
465					470					475				480	
Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	Ile	Glu
				485					490					495	
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Tyr
			500					505					510		
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys
		515					520					525			
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe
	530				535					540					
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu
545					550					555					560
Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr
				565					570					575	
Arg	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Gly	Glu	His	Glu	Ile	Ile	Pro
			580					585					590		
Leu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile
		595					600					605			
Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Met	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Ile	His	Ala
	610					615					620				
Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
625					630				635						640
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile
				645					650					655	
Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Pro	Asn	Trp	Trp	Ile	Val	Ser	Ala
			660					665					670		
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp
		675					680					685			
Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	His	Thr	Leu
	690					695					700				
Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Glu
705					710					715				720	
Met	Arg	Arg	Ala	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val
				725					730					735	
Thr	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Lys	Glu	Ala
			740					745					750		
Glu	Lys	Met	Ile	Val	Asn	Tyr	Phe	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Asp
		755					760					765			
Tyr	Ile	Gln	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg
	770					775					780				
Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Lys	Arg	Asp	Ile	Pro	Gln	Leu	Met	Ala	Arg	Asp
785					790					795					800
Arg	Asn	Thr	Gln	Ala	Glu	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Thr	Pro	Ile
				805					810					815	
Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Glu	Ile	Asp
			820					825					830		
Arg	Glu	Leu	Lys	Glu	Arg	Lys	Met	Arg	Ser	Lys	Met	Ile	Ile	Gln	Val
		835					840					845			
His	Asp	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Pro	Asn	Glu	Glu	Lys	Asp	Ala	Leu
	850				855					860					
Val	Glu	Leu	Val	Lys	Asp	Arg	Met	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Val
865					870					875					880
Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Gly	Lys	Thr	Trp	Ser			
				885					890						

<210> 39
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> *Thermotoga neopolitana*

5

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

10

<400> 39

Met Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asp Gly Thr Ala Leu Ala Tyr Arg Ala
 1 5 10 15

Tyr Tyr Ala Leu Asp Arg Ser Leu Ser Thr Ser Thr Gly Ile Pro Thr
 20 25 30
 Asn Ala Val Tyr Gly Val Ala Arg Met Leu Val Lys Phe Ile Lys Glu
 35 40 45
 His Ile Ile Pro Glu Lys Asp Tyr Ala Ala Val Ala Phe Asp Lys Lys
 50 55 60
 Ala Ala Thr Phe Arg His Lys Leu Leu Val Ser Asp Lys Ala Gln Arg
 65 70 75 80
 Pro Lys Thr Pro Ala Leu Leu Val Gln Gln Leu Pro Tyr Ile Lys Arg
 85 90 95
 Leu Ile Glu Ala Leu Gly Phe Lys Val Leu Glu Leu Glu Gly Tyr Glu
 100 105 110
 Ala Asp Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val Arg Ala Ala Arg Phe Leu
 115 120 125
 Met Arg Phe Ser Leu Ile Thr Gly Asp Lys Asp Met Leu Gln Leu Val
 130 135 140
 Asn Glu Lys Ile Lys Val Trp Arg Ile Val Lys Gly Ile Ser Asp Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Tyr Asp Ser Lys Lys Val Lys Glu Arg Tyr Gly Val Glu Pro
 165 170 175
 His Gln Ile Pro Asp Leu Leu Ala Leu Thr Gly Asp Asp Ile Asp Asn
 180 185 190
 Ile Pro Gly Val Thr Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Gln Leu Leu
 195 200 205
 Gly Lys Tyr Arg Asn Leu Glu Tyr Ile Leu Glu His Ala Arg Glu Leu
 210 215 220
 Pro Gln Arg Val Arg Lys Ala Leu Leu Arg Asp Arg Glu Val Ala Ile
 225 230 235 240
 Leu Ser Lys Lys Leu Ala Thr Leu Val Thr Asn Ala Pro Val Glu Val
 245 250 255
 Asp Trp Glu Glu Met Lys Tyr Arg Gly Tyr Asp Lys Arg Lys Leu Leu
 260 265 270
 Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Phe Ala Ser Ile Met Lys Glu Leu Gln
 275 280 285
 Leu Tyr Glu Glu Ala Glu Pro Thr Gly Tyr Glu Ile Val Lys Asp His
 290 295 300
 Lys Thr Phe Glu Asp Leu Ile Glu Lys Leu Lys Glu Val Pro Ser Phe
 305 310 315 320
 Ala Leu Asp Leu Glu Thr Ser Ser Leu Asp Pro Phe Asn Cys Glu Ile
 325 330 335
 Val Gly Ile Ser Val Ser Phe Lys Pro Lys Thr Ala Tyr Tyr Ile Pro
 340 345 350
 Leu His His Arg Asn Ala His Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Leu Ser
 355 360 365
 Lys Leu Lys Glu Ile Leu Glu Asp Pro Ser Ser Lys Ile Val Gly Gln
 370 375 380
 Asn Leu Lys Tyr Asp Tyr Lys Val Leu Met Val Lys Gly Ile Ser Pro
 385 390 395 400
 Val Tyr Pro His Phe Asp Thr Met Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Glu Pro
 405 410 415
 Asn Glu Lys Lys Phe Asn Leu Glu Asp Leu Ser Leu Lys Phe Leu Gly
 420 425 430
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Ser Pro Leu
 435 440 445 450
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Asp Lys Ala Ala Glu Tyr
 455 460
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Ile Leu Ser
 465 470 475 480
 Met Lys Leu His Glu Ala Glu Leu Glu Asn Val Phe Tyr Arg Ile Glu
 485 490 495
 Met Pro Leu Val Asn Val Leu Ala Arg Met Glu Phe Asn Trp Val Tyr
 500 505 510
 Val Asp Thr Glu Phe Leu Lys Lys Leu Ser Glu Glu Tyr Gly Lys Lys
 515 520 525
 Leu Glu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Tyr Gln Ile Ala Gly Glu Pro Phe
 530 535 540
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Asn Ile Leu Phe Glu Lys Leu
 545 550 555 560

Gly Ile Lys Pro Arg Gly Lys Thr Thr Lys Thr Gly Asp Tyr Ser Thr
 Arg Ile Glu Val 565 Leu Glu Glu Ile Ala Asn Glu His Glu Ile Val Pro
 Leu Ile Leu Glu Phe Arg Lys Ile Leu Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
 Asp Thr Leu Pro Lys Leu Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Phe His Ala
 Ser Phe His Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp
 625 Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile
 Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asp Trp Trp Ile Val Ser Ala
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
 Glu Asn Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu
 Thr Ala Ser Arg Ile Tyr Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Asn Glu Glu
 705 Met Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val
 Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Ile Pro Val Lys Glu Ala
 Glu Lys Met Ile Ile Ser Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Lys Val Arg Ser
 Tyr Ile Gln Gln Val Val Ala Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
 Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp
 785 Lys Asn Thr Gln Ser Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Asp Ile Asp
 Glu Glu Leu Arg Lys Arg Asn Met Lys Ser Arg Met Ile Ile Gln Val
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Glu Glu Lys Glu Glu Leu
 850 Val Asp Leu Val Lys Asn Lys Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
 865 Pro Leu Glu Val Asp Ile Ser Ile Gly Lys Ser Trp Ser
 885

<210> 40
 <211> 876
 5 <212> PRT
 <213> *Bacillus stearothermophilus*

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)

10 <400> 40

Met Lys Asn Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Asn Ser Val Ala Tyr Arg
 1 Ala Phe Phe Ala Leu Pro Leu Leu His Asn Asp Lys Gly Ile His Thr
 Asn Ala Val Tyr Gly Phe Thr Met 25 Leu Asn Lys Ile Leu Ala Glu
 35 Glu Gln Pro Thr His Ile Leu Val Ala Phe Asp Ala Gly Lys Thr Thr
 50 Phe Arg His Glu Thr Phe Gln Asp Tyr Lys Gly Gly Arg Gln Gln Thr
 65 Pro Pro Glu Leu Ser Glu Gln Phe Pro Leu Leu Arg Glu Leu Leu Lys
 85 Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Asp His Tyr Glu Ala Asp Asp
 100 Ile Ile Gly Thr Met Ala Ala Arg Ala Glu Arg Glu Gly Phe Ala Val
 110

Lys Lys Leu Ala Ala Ile Arg Arg Asp Ala Pro Val Glu Leu Ser Leu
 Asp Asp Ile Ala 245 Tyr Gln Gly Glu Asp Arg Glu Lys Val Val 255 Ala Leu
 Phe Lys Glu Leu 260 Gly Phe Gln Ser Phe Leu Glu Lys Met Glu Ser Pro
 Ser Ser Glu Glu Glu Lys Pro Leu Ala Lys Met Ala Phe Thr Leu Ala
 Asp Arg Val Thr Glu Glu 310 Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val Val 320
 Glu Val Val Glu Glu 325 Asn Tyr His Asp Ala Pro Ile Val Gly Ile Ala
 Val Val Asn Glu 340 His Gly Arg Phe Phe 345 Leu Arg Pro Glu Thr Ala Leu
 Ala Asp Pro Gln Phe Val Ala Trp Leu Gly Asp Glu Thr Lys Lys Lys
 Ser Met Phe Asp Ser Lys Arg Ala Ala Val Ala Leu Lys Trp Lys Gly
 Ile Glu Leu Cys Gly Val Ser Phe Asp Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Leu
 Leu Asp Pro Ala Gln 405 Gly Val Asp Asp Val Ala Ala Ala Lys Met
 Lys Gln Tyr Glu Ala Val Arg Pro Asp Glu Ala Val Tyr Gly Lys Gly
 Ala Lys Arg Ala Val Pro Asp Glu Pro Val Leu Ala Glu His Leu Val
 Arg Lys Ala Ala Ala Ile Trp Ala Leu Glu Arg Pro Phe Leu Asp Glu
 Leu Arg Arg Asn Glu Gln 470 Asp Arg Leu Leu Val Glu Leu Glu Gln Pro
 Leu Ser Ser Ile Leu 485 Ala Glu Met Glu Phe Ala Gly Val Lys Val Asp
 Thr Lys Arg Leu Glu Gln Met Gly Glu Glu Leu Ala Glu Gln Leu Arg
 Thr Val Glu Gln Arg Ile Tyr Glu 520 Leu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ile
 Asn Ser Pro Lys Gln Leu Gly Val Ile Leu Phe Glu Lys Leu Gln Leu
 Pro Val Leu Lys Lys Ser Lys Thr Gly Tyr Ser Thr Ser Ala Asp Val
 Leu Glu Lys Leu Ala 565 Pro Tyr His Glu Ile Val Glu Asn Ile Leu Gln
 His Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu
 Leu Lys Val Val Arg Pro Asp Thr Lys Lys Val His Thr Ile Phe Asn
 Gln Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Thr Glu Pro Asn Leu
 Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala
 Phe Val Pro Ser Glu Ser Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser
 Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu
 Met Glu Ala Phe Arg Arg Asp Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met
 Asp Ile Phe Gln Val Ser Glu 695 Asp Glu Val Thr Pro Asn Met Arg Arg
 Gln Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr
 Gly Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Ser Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe
 Ile Glu Arg Tyr Phe Glu Ser Phe Pro Gly Val Lys Arg Tyr Met Glu
 Asn Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu
 His Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val
 770 775 780

ES 2 536 252 T3

Arg 785	Ser	Phe	Ala	Glu	Arg 790	Met	Ala	Met	Asn	Thr 795	Pro	Ile	Gln	Gly	Ser 800
Ala	Ala	Asp	Ile	Ile 805	Lys	Lys	Ala	Met	Ile 810	Asp	Leu	Asn	Ala	Arg	Leu
Lys	Glu	Glu	Arg 820	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu 825	Leu	Leu	Gln	Val	His 830	Asp	Glu
Leu	Ile	Leu 835	Glu	Ala	Pro	Lys	Glu 840	Glu	Met	Glu	Arg	Leu 845	Cys	Arg	Leu
Val	Pro 850	Glu	Val	Met	Glu	Gln 855	Ala	Val	Thr	Leu	Arg 860	Val	Pro	Leu	Lys
Val 865	Asp	Tyr	His	Tyr	Gly 870	Ser	Thr	Trp	Tyr	Asp 875	Ala	Lys			

- 5 <210> 42
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa = His, Glu o Gln

- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)...(4)
- <223> Xaa = Pro, Thr o Glu

- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (6)...(6)
- <223> Xaa = Asn o His

- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (7)...(7)
- <223> Xaa = Leu o Ile

- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)...(8)
- <223> Xaa = Asn o Arg

- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (9)...(9)
- <223> Xaa = cualquier aminoácido

- 40 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (10)...(10)
- <223> Xaa = Arg, Pro o Ser

- 45 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (11)...(11)
- <223> Xaa = Asp, Lys o Thr

- 50 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (13)...(13)
- <223> Xaa = Leu o Val

- 55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp o Lys
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Leu o Val
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Arg o Asn
 20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile
 25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe
 30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Asp o Glu
 35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = Glu o Lys
 40

<400> 43

A1a Gly Xaa Pro Phe Asn Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Leu Xaa Xaa Xaa Leu
20

<210> 44
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45

<220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético
 50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = His o Glu
 55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Leu o Ile
 60

<220>

- <221> VARIANTE
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Arg o Pro
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)...(11)
<223> Xaa= Asp o Lys
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)...(13)
<223> Xaa = Leu o Val
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)...(14)
<223> Xaa = Glu o Ser
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = Val o Ile
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (18)...(18)
<223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (19)...(19)
<223> Xaa = Asp o Glu
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (20)...(20)
<223> Xaa = Glu o Lys
- 40 <400> 44
- Ala Gly Xaa Pro Phe Asn Xaa Asn Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Arg Xaa**
1 5 10 15
Leu Xaa Xaa Xaa Leu
20
- 45 <210> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = cualquier aminoácido
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)...(14)
<223> Xaa = cualquier aminoácido
- <220>
<221> VARIANTE

<222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe

<400> 45

5

Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

<210> 46
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Ser

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Glu

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Phe

30

<400> 46

Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

35

<210> 47
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = ser, Gly, Ala, Asp, Phe, Lys, Cys, Thr o Tyr

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Glu, Ser, Gln, Ala, Gly, Lys o Arg

55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asp o Lys

<400> 47

ES 2 536 252 T3

Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

5 <210> 48
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Thr, Asp o Lys

<400> 48

Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

20 <210> 49
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Motivo de dominio de ADN polimerasa sintético

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = His, Glu o Gln

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Pro, Thr o Glu

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Asn o His

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Leu o Ile

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Asn o Arg

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Arg, Pro o Ser

<220>
 <221> VARIANTE

ES 2 536 252 T3

<222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp, Lys o Thr

 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Leu o Val

 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Glu, ser, Ala o Gly

 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Arg, Asn, Tyr, Thr o Val

 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile

 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Gly, Ala, Leu, Met, Trp, Pro, Ser, Thr, Arg, Lys, Cys, Asn, Gln, Asp, Glu, Val, Ile o His

 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Asp o Glu

 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = Glu o Lys

 40 <400> 49

 Ala Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Leu Xaa Xaa Xaa Leu
 20

REIVINDICACIONES

5 1. Un ADN polimerasa que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 1 y que tiene actividad de diferenciación de desapareamientos 3' aumentada en comparación con un ADN polimerasa de control, en la que la ADN polimerasa comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-E-R-V-L-X₁₃-D-E-L, en el que:

10 X₁₃ es A, G, S, T, Y, D o K (SEC ID N°: 11), y en el que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto que el aminoácido X₁₃ de la ADN polimerasa de control es F.

2. La ADN polimerasa de la reivindicación 1, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEC ID N°: 1 es cualquier aminoácido distinto de D o E.

15 3. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de la SEC ID N°: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K.

20 4. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la polimerasa tiene al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 1.

5. La ADN polimerasa de la reivindicación 4, en la que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K.

25 6. Un ácido nucleico recombinante que codifica la ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un método para realizar extensión de cebadores, que comprende:

30 poner en contacto una ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con un cebador, un molde polinucleotídico, y nucleósido trifosfatos, en condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido.

8. Un kit para producir un cebador extendido, que comprende:

35 al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

9. El kit de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende además uno o más recipientes adicionales seleccionados del grupo que consiste en:

40 (a) un recipiente que proporciona un cebador hibridable, en condiciones de extensión de cebadores, con un molde polinucleotídico predeterminado;

(b) un recipiente que proporciona nucleósido trifosfatos; y

45 (c) un recipiente que proporciona un tampón adecuado para la extensión de cebadores.

10. Una mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, al menos un cebador, un molde polinucleotídico y nucleósido trifosfatos.

Figura 1

Z05	EEEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LRLPALGKT (SEC ID N°:12)
Taq	EAEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPAIGKT (SEC ID N°:13)
Tfi	EAEVHRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPPIGKT (SEC ID N°:14)
Tfl	EEEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPAIGKT (SEC ID N°:15)
Sps ¹⁷	EAEVHRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPPIGKT (SEC ID N°:16)
Tth	EEEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LRLPALGKT (SEC ID N°:17)
Tca	EEEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LRLPALGKT (SEC ID N°:18)
Tma	AAEIYRIAGE P FN I N S P K Q V S R I L F E K LGIKPRGKT (SEC ID N°:19)
Tne	AEKIYQIAGE P FN I N S P K Q V S N I L F E K LGIKPRGKT (SEC ID N°:20)
Taf	KEKVEIAGE T FN L N S S T Q V A Y I L F E K LNIAPY-KK (SEC ID N°:21)
Dra	ESQIHEYAGE E FH I R S P K Q L E T V L Y D K LELASSKKT (SEC ID N°:23)
Bst	ERRIYELAGQ E FN I N S P K Q L G T V L F D K LQLPVLKKT (SEC ID N°:24)
Bca	EQRIYELAGQ E FN I N S P K Q L G V I L F E K LQLPVLKKS (SEC ID N°:25)
	-----AGX ₁ X ₂ FX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ QX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ LX ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ L----- (SEC ID N°:26)

FIGURA 2

A. Identidades de secuencia sobre la enzima polimerasa I completa (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05)												
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tfi	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bca
Z05	0,864	0,833	0,859	0,839	0,839	0,962	0,958	0,459	0,374	0,368	0,359	0,408
Taq		0,831	0,854	0,836	0,836	0,872	0,864	0,468	0,382	0,368	0,351	0,397
Tfi			0,82	0,991	0,829	0,824	0,848	0,45	0,371	0,375	0,353	0,397
Tth				0,824	0,853	0,848	0,462	0,381	0,374	0,374	0,356	0,398
Sps17					0,835	0,83	0,989	0,452	0,375	0,377	0,355	0,407
Tca					0,83	0,989		0,46	0,371	0,365	0,356	0,404
Dra					0,452	0,463	0,46		0,334	0,325	0,314	0,338
Tma					0,375	0,373	0,371	0,334		0,558	0,567	0,376
Tne					0,377	0,367	0,365	0,325	0,854		0,558	0,356
Taf					0,355	0,358	0,356	0,314	0,567		0,356	0,364
Bca					0,407	0,406	0,404	0,338	0,37	0,377	0,356	0,881
					0,399	0,406	0,404	0,339	0,377	0,376	0,364	0,881
B. Identidades de secuencia sobre el subdominio de polimerasa solamente (correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05)												
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tfi	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bca
Z05		0,901	0,845	0,891	0,845	0,975	0,973	0,563	0,483	0,478	0,44	0,498
Taq			0,879	0,901	0,877	0,906	0,901	0,561	0,488	0,473	0,44	0,503
Tfi				0,857	0,997	0,853	0,853	0,566	0,495	0,49	0,449	0,512
Tth					0,855	0,889	0,889	0,571	0,492	0,48	0,444	0,485
Sps17						0,853	0,853	0,566	0,495	0,49	0,449	0,512
Tca							0,99	0,563	0,478	0,473	0,437	0,496
Dra								0,563	0,478	0,473	0,437	0,496
Tma									0,45	0,448	0,426	0,474
Tne										0,883	0,622	0,474
Taf											0,615	0,476
Bca												0,473
												0,898