

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 978**

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 11728779 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2582805**

54 Título: **ADN polimerasas con discriminación incrementada de no correspondencias 3'**

30 Prioridad:

18.06.2010 US 356280 P

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

01.06.2015

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 2 536 978 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 discriminación incrementada de no correspondencias 3'

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ADN polimerasas con discriminación incrementada de no correspondencia 3' y su utilización en diversas aplicaciones, incluyendo la extensión y amplificación de polinucleótidos de ácidos nucleicos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las ADN polimerasas son responsables de la replicación y mantenimiento del genoma, un papel que es crucial para transmitir con precisión la información genética de generación a generación. Las ADN polimerasas funcionan en las células como los enzimas responsables de la síntesis del ADN. Polimerizan los desoxirribonucleósidos trifosfato en presencia de un activador metálico, tal como Mg^{2+} , en un orden dictado por el molde de ADN o molde polinucleótido que se copia. *In vivo*, las ADN polimerasas participan en un abanico de procesos de síntesis del ADN, incluyendo la replicación del ADN, la reparación del ADN, la recombinación y la amplificación génica. Durante cada proceso de síntesis de ADN, se copia el molde de ADN una vez o como máximo unas pocas veces, produciendo réplicas idénticas. En contraste, *in vitro*, la replicación del ADN puede repetirse muchas veces, tal como, por ejemplo, durante la reacción en cadena de la polimerasa (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.683.202).

En los estudios iniciales de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se añadía la ADN polimerasa al inicio de cada ronda de replicación del ADN (ver la patente US nº 4.683.202, *in vivo*). Posteriormente se determinó que las ADN polimerasas termoestables podían obtenerse de bacterias que crecen a temperaturas elevadas, y que estos enzimas sólo necesitan añadirse una vez (ver las patentes US nº 4.889.818 y nº 4.965.188). A las elevadas temperaturas utilizadas durante la PCR, estos enzimas no resultan inactivados irreversiblemente. En consecuencia, pueden llevarse a cabo ciclos repetitivos de reacciones en cadena de polimerasa sin añadir enzimas frescos al inicio de cada proceso de adición sintética. Las ADN polimerasas, en particular las polimerasas termoestables, son la clave para un gran número de técnicas en estudios de ADN recombinante y en el diagnóstico médico de enfermedades. Para las aplicaciones diagnósticas en particular, una secuencia diana de ácidos nucleicos puede ser meramente una porción pequeña del ADN o ARN en cuestión, de manera que puede resultar difícil detectar la presencia de una secuencia diana de ácidos nucleicos sin la amplificación.

El patrón de pliegue global de las ADN polimerasas es similar al de la mano derecha humana y contiene tres subdominios diferentes de palma, dedos y pulgar (ver 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 mucho entre polimerasas que difieren en el tamaño y en las funciones celulares, los subdominios de palma catalíticos son todos superponibles. Por ejemplo, el motivo A, que interactúa con el dNTP entrante y estabiliza el estado de transición durante la catálisis química, es superponible con una desviación promedio de aproximadamente un Å entre la pol α de mamíferos y las ADN polimerasas de la familia procarriótica de pol I (Wang *et al.*, Cell 89:1087-1099, 1997). El motivo A se inicia estructuralmente en una cadena β antiparalela que contiene predominantemente residuos hidrofóbicos y continúa a una hélice α . La secuencia de aminoácidos primaria de los sitios activos de la ADN polimerasa se encuentra excepcionalmente conservada. En el caso del motivo A, por ejemplo, la secuencia DYSQIELR (SEC ID nº 28) se conserva en las polimerasas de organismos separados por muchos millones de años de evolución, entre ellos, por ejemplo, *Thermus aquaticus*, *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli*.

Además, de estar bien conservado, el sitio activo de las ADN polimerasas también ha demostrado ser relativamente mutable, capaz de ajustarse a determinadas sustituciones de aminoácidos sin reducir significativamente la actividad de la ADN polimerasa (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.602.695). El documento nº WO 2008/046612 da a conocer ADN polimerasas ZO5 que comprenden una mutación del residuo aminoácido D en residuo aminoácido G en la posición 580, que presentan tasas de extensión mejoradas en comparación con una polimerasa no modificada correspondiente. Dichas ADN polimerasas mutantes puede ofrecer diversas ventajas selectivas en, por ejemplo, aplicaciones diagnósticas y de investigación que comprenden reacciones de síntesis de ácidos nucleicos. De esta manera, existe una necesidad en la técnica de identificar las posiciones de aminoácidos que pueden mutarse para rendir actividades mejoradas de polimerasa. La presente invención, tal como se proporciona en la presente memoria, satisface ésta y otras necesidades.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

En la presente memoria se proporcionan ADN polimerasas que presentan una discriminación incrementada de no correspondencias 3' en comparación con una polimerasa de control no modificada correspondiente, y métodos de preparación y utilización de estas 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 según la invención presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 y presenta una actividad de discriminación incrementada de no correspondencias 3' en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que la ADN polimerasa comprende un motivo en el dominio de polimerasa que

comprende K-L-K-X₂-T-X₃-X₄-D-P-L-P, en el que X₂ es S o N, X₃ es C o N, y X₄ es V o I (SEC ID n° 11) y en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID n° 1 es G, y en la que la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido X₃ de la ADN polimerasa es Y. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermus*. También se da a conocer que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermotoga*. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 es cualquier aminoácido diferente de Y, y que la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 es Y. Por ejemplo, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, N, Q, D, E, K, R o H. Se da a conocer además que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 es un aminoácido que presenta una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo G, A, L, M, W, P, F, C, V o I) o una cadena lateral sin carga polar (por ejemplo N, Q, H, S o T). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 es C o N. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 es C. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID n° 1 es N.

Se da a conocer además que la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de la no correspondencia 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende K-L-X₁-X₂-T-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈, en la que:

X₁ es K, R o Q, X₂ es N, S o G,
 X₃ es cualquier residuo aminoácido diferente de Y,
 X₄ es V, I o L,
 X₅ es D o E,
 X₆ es P, A, T, S o G,
 X₇ es L o I,
 y X₈ es P o L (SEC ID n° 8).

Se da a conocer además que X₃ se selecciona de entre G, A, L, M, W, P, S, T, F, C, N, Q, D, E, K, R, V, I or H (SEC ID n° 42).

Se da a conocer además que la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de la no correspondencia 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende K-L-X₁-X₂-T-X₃-X₄-D-X₆-L-P, en el que:

X₂ es N o S,
 X₃ es cualquier residuo aminoácido diferente de Y,
 X₄ es V o I,
 y X₆ es P o A (SEC ID n° 9).

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de la no correspondencia 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende K-L-K-X₂-T-X₃-X₄-D-P-L-P, en el que:

X₂ es N o S,
 X₃ es C o N,
 y X₄ es V o I (SEC ID n° 11).

Se da a conocer además que X₃ es un aminoácido que presenta una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo C, I, L, M, F, P, W o V) o una cadena lateral sin carga polar (diferente de Y, es decir, N, Q, H, S o T).

Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID n° 1 es cualquier aminoácido diferente de D o E. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID n° 1 es cualquier aminoácido diferente de D. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID n° 1 se selecciona de entre el grupo que consiste de 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.

Diversas ADN polimerasas pueden mutarse según la presente exposición. Resultan particularmente adecuadas las polimerasas termoestables, incluyendo las polimerasas termoestables de tipo salvaje o naturales de diversas especies de bacterias termofílicas, así como polimerasas termoestables sintéticas derivadas de dichos enzimas de tipo salvaje o naturales mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos, u otra modificación. Entre las formas no modificadas ejemplares de polimerasa se incluyen, CS5 (SEC ID n° 29), CS6 (SEC ID n° 30) o ADN polimerasa Z05. 1) o una ADN polimerasa funcional que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a la misma. Entre otras polimerasas no modificadas se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de cualquiera de las especies de bacterias termofílicas siguientes (o de una ADN polimerasa funcional que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a

dicha polimerasa): *Thermotoga maritima* (SEC ID nº 38), *Thermus aquaticus* (SEC ID nº 2), *Thermus thermophilus* (SEC ID nº 6), *Thermus flavus* (SEC ID nº 4), *Thermus filiformis* (SEC ID nº 3), *Thermus* sp. Sps17 (SEC ID nº 5), *Thermus* sp. Z05 (SEC ID nº 1), *Thermotoga neopolitana* (SEC ID nº 39), *Thermosiphon africanus* (SEC ID nº 37), *Thermus caldophilus* (SEC ID nº 7), *Deinococcus radiodurans* (SEC ID nº 36), *Bacillus stearothermophilus* (SEC ID nº 40) o *Bacillus caldotenax* (SEC ID nº 41). Entre las polimerasas adecuadas se incluyen también las que presentan actividad de transcriptasa inversa (TI) y/o la capacidad de incorporar nucleótidos no convencionales, tales como ribonucleótidos u otros nucleótidos 2'-modificados.

Aunque las ADN polimerasas termoestables que presentan una actividad de discriminación de no correspondencias 3' eficiente resultan particularmente adecuadas para llevar a cabo la PCR, las ADN polimerasas termoactivas, pero no termoestables, que presentan una actividad de discriminación de no correspondencias 3' eficiente también pueden someterse a mutación según la presente exposición.

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de *Thermus*. Se da a conocer además que la ADN polimerasa presenta una identidad de secuencias de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a una polimerasa seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- (a) una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05) (SEC ID nº 1),
- (b) una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID nº 2),
- (c) una ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi) (SEC ID nº 3),
- (d) una ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl) (SEC ID nº 4),
- (e) una ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17) (SEC ID nº 5),
- (f) una ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID nº 6), y
- (g) una ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca) (SEC ID nº 7).

Se da a conocer además que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de *Thermotoga*. Por ejemplo, la ADN polimerasa presenta una identidad de secuencias de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a una polimerasa seleccionada de entre el grupo que consiste de:

- (a) una ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID nº 38),
- (b) una ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEC ID nº 39).

En determinadas realizaciones, la ADN polimerasa presenta una identidad de secuencias de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05) (es decir, SEQ ID NO: 1), excepto en que el aminoácido en la posición 547 es cualquier aminoácido diferente de Y. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 547 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, 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 547 es cualquier aminoácido diferente de Y. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 547 es C o N. 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 diferente 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 diferente de D. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 se selecciona de entre el grupo que consiste de 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 estas modificaciones es una modificación covalente térmicamente reversible que inactiva el enzima pero que se revierte para activar el enzima con la incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura utilizada típicamente para la extensión de polinucleótidos. Los reactivos ejemplares para dichas modificaciones térmicamente reversibles se describen en las patentes US nº 5.773.258 y nº 5.677.152 de Birch *et al*.

En algunas realizaciones, la actividad de no correspondencia 3' se determina utilizando un polinucleótido diana BRAF V600R mutante que presenta la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 35 (BRAV de tipo salvaje=SEC ID nº 34) en presencia de un cebador directo que es perfectamente correspondiente con la secuencia mutante y presenta una única no correspondencia A:C 3' respecto a la secuencia de tipo salvaje en una o más mezclas de reacción que presentan un número predeterminado de copias de polinucleótido diana BRAF V600 de tipo salvaje y un número predeterminado de copias de polinucleótido diana BRAF V600R mutante igual en número o de menor número que el número de copias de diana de tipo salvaje (por ejemplo 10.000 o menos copias). Dos o más mezclas de reacción pueden presentar números titulados de copias de polinucleótido diana BRAF V600R mutante (por ejemplo titulaciones 1:5, titulaciones 1:10, por ejemplo 10.000 copias, 1.000 copias, 100 copias, 10 copias, 1 copia, 0 copias en varias mezclas de reacción). La capacidad de discriminación de no correspondencias 3' de una polimerasa de la invención puede compararse con la capacidad de discriminación de no correspondencia 3' de una polimerasa de referencia (por ejemplo una polimerasa no modificada o natural), en una unidad de tiempo preseleccionada, tal como se indica en la presente memoria. Las polimerasas con capacidad incrementada de discriminación de no correspondencias 3' no amplificarán la secuencia de tipo salvaje al ponerlas en contacto con un cebador que sea

perfectamente correspondiente con un alelo mutante, o requerirán un número mayor de ciclos de PCR para amplificar la secuencia de tipo salvaje utilizando el cebador mutante específico de alelo (es decir, mostrarán un valor de C_p más alto), en comparación con una polimerasa no modificada o natural.

5 En diversos otros aspectos, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante codificante de una ADN polimerasa mutante o mejorada tal como se describe en la presente memoria, un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y/o una célula huésped transformada con el vector. En determinadas realizaciones el vector es un vector de expresión. Las células huésped que comprenden dichos vectores de expresión resultan útiles en métodos de la invención para producir la polimerasa mutante o mejorada mediante el cultivo de las células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante. Las polimerasas de la invención pueden encontrarse contenidas en mezclas de reacción y/o kits. Las realizaciones de los ácidos nucleicos recombinantes, células huésped, vectores, vectores de expresión, mezclas de reacción y kits son tal como se han indicado anteriormente y se indican en la presente memoria.

15 En todavía otro aspecto, se proporciona un método para llevar a cabo la extensión de polinucleótidos. El método incluye generalmente poner en contacto una ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' tal como se indica en la presente memoria, con un cebador, un molde polinucleótido y nucleósidos trifosfato bajo condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido. El molde polinucleótido puede ser, por ejemplo, un molde de ARN o ADN. Entre los nucleósidos trifosfato pueden incluirse 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 nucleótido. En algunas variaciones, el método de extensión de polinucleótido es un método para la amplificación de polinucleótidos que incluye poner en contacto la ADN polimerasa mutante o mejorada con una pareja de cebadores, el molde polinucleótido y los nucleósidos trifosfato bajo condiciones adecuadas para la amplificación del polinucleótido. La reacción de extensión del polinucleótido puede ser, por ejemplo, PCR, extensión isotérmica o secuenciación (por ejemplo la reacción de secuenciación de 454).

En algunas realizaciones, el método de extensión del cebador es un método para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención proporciona además un kit útil en dicho método de extensión de polinucleótidos. Generalmente, el kit incluye por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa mutante o mejorada tal como se indica en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el kit incluye además uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, en variaciones específicas, el recipiente o recipientes adicionales proporcionan nucleósidos trifosfato, un tampón adecuado para la extensión de polinucleótidos y/o un cebador hibridable, bajo condiciones de extensión de polinucleótidos, a un molde polinucleótido predeterminado.

Se proporcionan además mezclas de reacción que comprenden las polimerasas de la invención. Las mezclas de reacción pueden contener además un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos cebadores o de sonda, nucleósidos trifosfato (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos marcados, nucleótidos no convencionales), tampones, sales, marcajes (por ejemplo fluoróforos).

En la presente memoria se describen realizaciones adicionales de la invención.

DEFINICIONES

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, sólo se describen métodos y materiales ejemplares. Para los fines de la presente invención se definen a continuación los términos siguientes.

Las formas singulares, tales como "un", "una", "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Un "aminoácido" se refiere a cualquier unidad monomérica que puede incorporarse en un péptido, polipéptido o proteína. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye los veinte alfa-aminoácidos naturales o genéticamente codificados: 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 los casos en que los "X" residuos no están definidos, estos deben definirse como "cualquier aminoácido". Las estructuras de estos veinte aminoácidos naturales se muestran en, por ejemplo, Stryer *et al.*, Biochemistry, 5a ed., Freeman and Company, 2002. Algunos aminoácidos adicionales, tales como la selenocisteína y la pirrolisina, también pueden encontrarse codificados genéticamente (Stadtman, "Selenocysteine", Annu. Rev. Biochem. 65:83-100, 1996, e Ibbá *et al.*, "Genetic code: introducing pyrrolysine", Curr. Biol. 12(13):R464-R466, 1996). El término "aminoácido" incluye

además aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados (por ejemplo que presentan cadenas laterales y/o esqueletos modificados) y análogos de aminoácidos. Ver, por ejemplo, Zhang *et al.*, "Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(24):8882-8887, 2004; Anderson *et al.*, "An expanded genetic code with a functional quadruplet codon", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(20):7566-7571, 2004; Ikeda *et al.*, "Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein *in vivo*", Protein Eng. Des. Sel. 16(9):699-706, 2003; Chin *et al.*, "An Expanded Eukaryotic Genetic Code", Science 301(5635):964-967, 2003; James *et al.*, "Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues", Protein Eng. Des. Sel. 14(12):983-991, 2001; Kohrer *et al.*, "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, 2001; Bacher *et al.*, "Selection and Characterization of *Escherichia coli* VARIANTEs Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue", J. Bacteriol. 183(18):5414-5425, 2001; Hamano-Takaku *et al.*, "A Mutant *Escherichia coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine", J. Biol. Chem. 275(51):40324-40328, 2000, y Budisa *et al.*, "Proteins with β -(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids," Protein Sci. 10(7):1281-1292, 2001.

A título ilustrativo adicional, 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 laterales o grupos, o análogos de cualquiera de dichos grupos. Entre las cadenas laterales ejemplares se incluyen, por ejemplo, tiol, seleno, sulfonilo, alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina o cualquier combinación de dichos grupos. Entre otros aminoácidos representativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aminoácidos que comprenden entrecruzantes fotoactivables, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos de espín marcado, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que contienen metal, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interactúan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoenjaulados y/o fotoisomerizables, aminoácidos radioactivos, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente cortables y/o fotocortables, aminoácidos que contienen azúcares unidos mediante carbonos, aminoácidos redox activos, aminoácidos que contienen aminotioácido y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

El término "aptámero" se refiere a un ADN de cadena sencilla que reconoce y se une a la ADN polimerasa e inhibe eficientemente la actividad de la polimerasa, tal como se describe en la patente US nº 5.693.502.

El término "mutante", en el contexto de las ADN polimerasas de la presente invención, se refiere a un polipéptido, típicamente recombinante, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos respecto a una ADN polimerasa natural o no modificada correspondiente.

La expresión "forma no modificada", en el contexto de una polimerasa mutante, es una expresión utilizada en la presente memoria con 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 presenta la secuencia de aminoácidos de la polimerasa mutante excepto en una o más posiciones de aminoácidos especificadas como caracterizadoras de la polimerasa mutante. De esta manera, la referencia a una ADN polimerasa mutante en términos de (a) su forma no modificada y (b) una o más sustituciones de aminoácidos especificadas, se refiere a que, con la excepción de la sustitución o sustituciones de aminoácidos especificadas, la polimerasa mutante presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la forma no modificada en el motivo especificado.

La "polimerasa no modificada" (y por lo tanto también la forma modificada que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3') puede contener mutaciones adicionales para proporcionar la funcionalidad deseada, por ejemplo una incorporación mejorada de dideoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, análogos de ribonucleótido, nucleótidos marcados con pigmento, modulación de la actividad de nucleasa 5', modulación de la actividad de nucleasa (o correctora de errores) 3', o similar. De acuerdo con lo anterior, al llevar a cabo la presente invención tal como se describe en la presente memoria, la forma no modificada de una ADN polimerasa se encuentra predeterminada. La forma no modificada de una ADN polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa de tipo salvaje y/o una ADN polimerasa natural, o una ADN polimerasa que ya ha sido modificada deliberadamente. Una forma no modificada de la polimerasa preferentemente es una ADN polimerasa termoestable, tal como las ADN polimerasas de diversas bacterias termofílicas, así como Variantes funcionales de las mismas que presentan identidad de secuencia respecto a una polimerasa termoestable de tipo salvaje o natural. Entre dichas Variantes pueden incluirse, por ejemplo, ADN polimerasas quiméricas tales como, por ejemplo, las ADN polimerasas quiméricas indicadas en la patente US nº 6.228.628 y en la solicitud de patente US publicada nº 2004/0005599. En determinadas realizaciones, la forma no modificada de una polimerasa presenta actividad de transcriptasa inversa (TI).

La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a un enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad para llevar a cabo reacciones posteriores de extensión de polinucleótido y no resulta irreversiblemente desnaturada (inactivada) tras someterla a las temperaturas elevadas durante el tiempo

necesario para desnaturalizar ácidos nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de los ácidos nucleicos son bien conocidas de la técnica y se ejemplifican en, por ejemplo, las patentes US nº 4.683.202, nº 4.683.195 y nº 4.965.188. Tal como se utiliza en la presente memoria, una polimerasa termoestable resulta adecuada para la utilización en una reacción de ciclado térmico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La desnaturalización irreversible para los fines de la presente memoria se refiere a una pérdida permanente y completa de la actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, "actividad enzimática" se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de la manera correcta para formar productos de extensión de polinucleótido que son complementarios a una cadena molde de ácidos nucleicos. Entre las ADN polimerasas termoestables procedentes de bacterias termofílicas se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus species Sps17*, *Thermus species Z05*, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosiphon africanus*.

El término "termoactivo" se refiere a un enzima que mantiene las propiedades catalíticas a temperaturas utilizadas comúnmente para las etapas de transcripción inversa o hibridación/extensión en las reacciones de RT-PCR y/o PCR (es decir, 45°C a 80°C). Los enzimas termoestables son aquellos que no resultan irreversiblemente inactivados o desnaturalizados al someterlos a las temperaturas elevadas necesarias para la desnaturalización de los ácidos nucleicos. Los enzimas termoactivos pueden ser o no termoestables. Las ADN polimerasas termoactivas pueden ser dependientes de ADN o ARN de especies termofílicas o de especies mesofílicas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, *Escherichia coli*, virus de la leucemia murina de Moloney y virus de la mioblastosis aviar.

Tal como se utiliza en la presente memoria, 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 por lo menos dos proteínas diferentes. Una proteína quimérica típicamente no se produce mediante manipulación directa de las secuencias de aminoácidos sino que, por el contrario, se expresa a partir de un gen "quimérico" que codifica la secuencia de aminoácidos quimérica. En determinadas realizaciones, por ejemplo, una forma no modificada de una ADN polimerasa mutante de la presente invención es una proteína quimérica que consiste de una región aminoterminal (N-terminal) derivada de una ADN polimerasa de una especie de *Thermus* y una región carboxiterminal (C-terminal) derivada de la ADN polimerasa Tma. La región N-terminal se refiere a una región que se extiende entre el extremo N-terminal (posición aminoácida 1) y un aminoácido interno. De manera similar, la región C-terminal se refiere a una región que se extiende desde un aminoácido interno y el extremo C-terminal.

En el contexto de las ADN polimerasas, "correspondencia" con otra secuencia (por ejemplo regiones, fragmentos, posiciones de nucleótidos o aminoácidos, o similares) se basa en la convención de numerar las posiciones de los nucleótidos o aminoácidos y posteriormente alinear las secuencias de manera que se maximice el porcentaje de identidad de las secuencias. Debido a que no todas las posiciones dentro de una "región correspondiente" dada necesitan ser idénticas, las posiciones no correspondientes dentro de una región correspondiente pueden considerarse "posiciones correspondientes". De acuerdo con lo anteriormente expuesto, tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a una "posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido [X]" de una ADN polimerasa especificada se refiere a posiciones equivalentes, basadas en la alineación, en otras ADN polimerasas y homólogos y familias estructurales. 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 nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41. En el caso de que una secuencia polipeptídica de polimerasa difiera de las SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41 (por ejemplo por cambios en los aminoácidos o la adición o delección de aminoácidos), puede ser que una mutación particular asociada a actividad mejorada tal como se comenta en la presente memoria no se encuentre en el mismo número de posición que en las SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41. Lo anterior se ilustra en, por ejemplo, la Tabla 1.

El término "recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que ha sido modificada deliberadamente mediante métodos recombinantes. La expresión "ácido nucleico recombinante" en la presente memoria se refiere a un ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de un ácido nucleico por parte de endonucleasas, para producir una forma no observada normalmente en la naturaleza. De esta manera, un ácido nucleico aislado de ADN polimerasa mutante, en una forma lineal, o un vector de expresión formando *in vitro* mediante el ligamiento de moléculas de ADN que normalmente no se encuentran unidas, se consideran ambas recombinantes para los fines de la presente invención. Se entiende que una vez se ha preparado un ácido nucleico recombinante y se ha reintroducido en una célula huésped, se replicará de manera no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped y no mediante manipulaciones *in vitro*; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez se han producido recombinantemente, aunque posteriormente se repliquen no recombinantemente, todavía se consideran recombinantes para los fines de la invención. Una "proteína recombinante" es una proteína generada utilizando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se ha ilustrado anteriormente.

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se encuentre en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión

ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre posicionado de manera que facilite la traducción.

5 La expresión "célula huésped" se refiere a organismos unicelulares tanto procarióticos como eucarióticos (por ejemplo bacterias, levaduras y actinomicetos) y células individuales de plantas o animales de orden superior cultivados en cultivo celular.

10 El término "vector" se refiere a un trozo de ADN, típicamente de doble cadena, en el que puede haberse insertado un trozo de ADN foráneo. El vector puede ser, por ejemplo, de origen plasmídico. Los vectores contienen secuencias polinucleótidas de "replicón" que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula huésped. El ADN foráneo se define como ADN heterólogo, que es ADN no presente naturalmente en la célula huésped, que, por ejemplo, replica la molécula del vector, codifica un marcador seleccionable o cribable, o codifica para un transgén. El vector se utiliza para transportar el ADN foráneo o heterólogo al interior de una célula huésped adecuada. Una vez dentro de la célula huésped, el vector puede replicarse independientemente o concurrentemente con el ADN cromosómico del huésped, y pueden generarse varias copias del vector y su ADN insertado. Además, el vector puede contener además los elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado para formar una molécula de ARNm o de otro modo provocar la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión adicionalmente contienen elementos de secuencia contiguos al ADN insertado que incrementan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula de proteína. De esta manera, pueden sintetizarse rápidamente muchas moléculas de ARNm y del polipéptido codificado por el ADN insertado.

25 El término "nucleótido", además de referirse a los monómeros ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos naturales, en la presente memoria se entenderá que se refiere a Variantes estructurales relacionadas de los mismos, incluyendo derivados y análogos, que son funcionalmente equivalentes con respecto al contexto particular en el que se está utilizando el nucleótido (por ejemplo la hibridación con una base complementaria), a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que puede ser correspondiente de un ácido nucleico de ribosa (ARN) o un polímero ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo de los mismos. Lo anterior incluye polímeros de nucleótidos, tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo química o bioquímicamente modificadas) de las mismas, y polímeros mixtos (por ejemplo subunidades de tanto ARN como ADN, entre otros). Entre las modificaciones ejemplares se incluyen metilación, sustitución de uno o más nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleótidas tales como enlaces sin carga (por ejemplo metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), fracciones colgantes (por ejemplo polipéptidos), intercalantes (por ejemplo acridina, psoralén y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo ácidos nucleicos anoméricos alfa y similares). También se encuentran incluidas moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad de unirse a una secuencia designada, mediante enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros nucleótidos se unen mediante enlaces fosfodiéster, aunque algunas formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo ácido péptido-nucleicos, tal como se indica 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, de cadena sencilla, de doble cadena o de triple cadena, y no se encuentra limitado a ninguna longitud en particular. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

50 El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos unidades monoméricas de ácidos nucleicos (por ejemplo nucleótidos). Un oligonucleótido típicamente incluye entre aproximadamente seis y aproximadamente 175 unidades monoméricas de ácidos nucleicos, más típicamente entre aproximadamente ocho y aproximadamente 100 unidades monoméricas de ácidos nucleicos, y todavía más típicamente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 unidades monoméricas de ácidos nucleicos (por ejemplo aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o más unidades monoméricas de ácidos nucleicos). El tamaño exacto de un oligonucleótido depende de muchos factores, incluyendo la función última o utilización del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier método adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante 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 dietilfosforamidita 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); los métodos de síntesis automatizada, o el método de soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, u otros métodos conocidos por el experto en la materia.

65 El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polinucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ácidos nucleicos dirigida por molde en caso de encontrarse bajo condiciones en que

se inicia la extensión del polinucleótido (por ejemplo bajo condiciones que comprenden la presencia de los nucleósidos trifosfato necesarios (tal como dicta el molde que se copia) y una polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura o ciclo o ciclos de temperatura adecuados (por ejemplo tal como en una reacción en cadena de polimerasa)). A título ilustrativo adicional, los cebadores también pueden utilizarse en una diversidad de otros procedimientos de síntesis mediados por oligonucleótidos, incluyendo como iniciadores de la síntesis de ARN *de novo* y en procedimientos *in vitro* relacionados con la transcripción (por ejemplo la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (ABSAN), la amplificación mediada por la transcripción (AMT), etc.). Un cebador es típicamente un oligonucleótido de cadena sencilla (por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido). La longitud apropiada de un cebador depende de la utilización pretendida del cebador, aunque típicamente se encuentra comprendida entre 6 y 40 nucleótidos, más típicamente entre 15 y 35 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no debe reflejar necesariamente la secuencia exacta del molde, pero debe ser suficientemente complementario para hibridarse con un molde para que se produzca la elongación del cebador. En determinadas realizaciones, la expresión "pareja de cebadores" se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador de sentido 5' (en ocasiones denominado "directo") que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que debe amplificarse, y un cebador antisentido 3' (en ocasiones denominado "inverso") que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia que debe amplificarse (por ejemplo en el caso de que la secuencia diana se exprese como ARN o sea un ARN). Un cebador puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, entre los marcajes útiles se incluyen ³²P, pigmentos fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (tales como los utilizados comúnmente en los ensayos de ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales.

La expresión "sonda de nucleasa 5'" se refiere a un oligonucleótido que comprende por lo menos una fracción de marcaje emisora de luz y que se utiliza en una reacción de nucleasa 5' para llevar a cabo la detección del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, por ejemplo, una sonda de nucleasa 5' incluye únicamente una sola fracción emisora de luz (por ejemplo un pigmento fluorescente, etc.). En determinadas realizaciones, una sonda de nucleasa 5' incluye regiones de autocomplementariedad de manera que las sondas son capaces de formar estructuras de horquilla bajo condiciones seleccionadas. A título ilustrativo adicional, en algunas realizaciones una sonda de nucleasa 5' comprende por lo menos dos fracciones de marcaje y emite radiación de intensidad creciente después de que uno de los dos marcajes se escinda o de otro modo se separe del oligonucleótido. En determinadas realizaciones, se marca una sonda de nucleasa 5' con dos pigmentos fluorescentes diferentes, por ejemplo un pigmento informador en el extremo 5' y el pigmento o fracción inhibidor en el extremo 3'. En algunas realizaciones, las sondas de nucleasa 5' se marcan en una o más posiciones aparte de, o además de, las posiciones terminales. En el caso de que la sonda se encuentre intacta, la transferencia de energía típicamente ocurre entre los dos fluoróforos, de manera que la emisión fluorescente del pigmento informador resulta inhibida por lo menos en parte. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de polimerasa, por ejemplo, una sonda de nucleasa 5' unida a un ácido nucleico molde se escinde por la actividad de nucleasas 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq u otra polimerasa que presente dicha actividad, de manera que la emisión fluorescente del pigmento informador ya no se encuentra inhibida. También se describen sondas de nucleasa 5' ejemplares en, por ejemplo, las patentes US nº 5.210.015, nº 5.994.056 y nº 6.171.785. En otras realizaciones, una sonda de nucleasa 5' puede marcarse con dos o más pigmentos informadores diferentes y un pigmento o fracción inhibidora 3'-terminal.

El término "FRET" o "transferencia de energía de resonancia fluorescente" o "transferencia de energía de resonancia de Foerster" se refiere a una transferencia de energía entre por lo menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado inhibidor). El donante típicamente transfiere la energía al aceptor cuando el donante es excitado por radiación lumínica de una longitud de onda adecuada. El aceptor típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. En el caso de que el aceptor sea un inhibidor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma que no es luz. Que un fluoróforo particular actúe como donante o aceptor depende de las propiedades del otro elemento de la pareja FRET. Entre las parejas de donante-aceptor utilizadas comúnmente se incluyen la pareja FAM-TAMRA. Son inhibidores utilizados comúnmente, DABCILo y TAMRA. Entre los inhibidores oscuros utilizados comúnmente se 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" en referencia a bases de ácidos nucleicos, nucleósidos trifosfato o nucleótidos se refiere a aquellos presentes naturalmente en el polinucleótido que se describe (es decir, para el ADN son dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Además, se utilizan frecuentemente dITP y 7-deaza-dGTP en lugar de dGTP, y 7-deaza-dATP puede utilizarse en lugar de dATP en reacciones de síntesis de ADN *in vitro*, tales como la secuenciación. Colectivamente pueden denominarse dNTP.

La expresión "no convencional" o "modificado" en referencia a una base de ácidos nucleicos, nucleósido o nucleótido incluye las modificaciones, derivaciones o análogos de bases convencionales, nucleósidos o nucleótidos que se observan naturalmente en un polinucleótido particular. Determinados nucleótidos no convencionales se encuentran modificados en la posición 2' del azúcar ribosa en comparación con los dNTP convencionales. De esta manera, aunque para el ARN los nucleótidos naturales son ribonucleótidos (es decir, ATP, GTP, CTP, UTP, colectivamente

rNTP), debido a que estos nucleótidos presentan un grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar que, por el contrario, se encuentra ausente en los dNTP, tal como se utiliza en la presente memoria, los ribonucleótidos son nucleótidos no convencionales como sustratos para las ADN polimerasas. Tal como se utiliza en la presente memoria, entre los nucleótidos no convencionales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, compuestos utilizados como terminadores para la secuenciación de ácidos nucleicos. Entre los compuestos terminadores ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, compuestos que presentan una estructura de 2',3'-dideoxi y se denominan dideoxinucleósidos trifosfato. Los dideoxinucleósidos trifosfato ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP se denominan colectivamente ddNTP. Entre los ejemplos adicionales de compuestos terminadores se incluyen los análogos 2'-PO₄ de los ribonucleótidos (ver, por ejemplo, las solicitudes publicadas de patente US n° 2005/0037991 y n° 2005/0037398). Entre otros nucleótidos no convencionales se incluyen los dNTP fosforioato ([[α]-S]dNTPs), los dNTP 5'-[α]-borano, los dNTP [α]-metil-fosfonato y los ribonucleósidos trifosfato (rNTP). Las bases no convencionales pueden marcarse con isótopos radioactivos tales como ³²P, ³³P o ³⁵S, marcajes fluorescentes, marcajes quimioluminiscentes, marcajes bioluminiscentes, marcajes haptenos tales como biotina, o marcajes enzimáticos tales como estreptavidina o avidina. Entre los marcajes fluorescentes pueden incluirse pigmentos con carga negativa, tales como pigmentos de la familia de la fluoresceína, o pigmentos de carga neutra, tales como pigmentos de la familia de la rodamina, o pigmentos con carga positiva, tales como los pigmentos de la familia de la cianina. Entre los pigmentos de la familia de la fluoresceína se incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Entre los pigmentos de la familia de la rodamina se incluyen rojo Texas, ROX, R110, R6G y TAMRA. Diversos pigmentos o nucleótidos marcados con FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, rojo Texas y TAMRA son comercializados por Perkin-Elmer (Boston, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA) o Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). Entre los pigmentos de la familia de la cianina se incluyen Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 y son comercializados por GE Healthcare UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de identidad de secuencias" se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la 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 la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa una base de ácidos nucleicos o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

Los términos "idéntico" e "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" en el caso de que presenten un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos aminoácidos que son iguales (por ejemplo por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad en una región especificada), al comparar y alinear para la máxima correspondiente en una ventana de comparación o región designada según se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguientes o mediante alineación manual e inspección visual. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos, o más típicamente en una región de 100 o 500 o 1.000 o más nucleótidos de longitud.

Las expresiones "similitud" o "porcentaje de similitud" en el contexto de dos o más secuencias de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que presentan un porcentaje especificado de residuos aminoácidos que son iguales o similares según definen las sustituciones conservadoras de aminoácidos (por ejemplo una similitud de 60%, opcionalmente similares al 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en una región especificada), al compararse y alinearse para la máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designada según se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguiente, o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí en el caso de que sean por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50% o por lo menos 55% similares entre sí. Opcionalmente, esta similitud existe en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos, o más típicamente en una región de por lo menos aproximadamente 100 a 500 o 1.000 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación entre secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con las que se comparan las secuencias de ensayo. Al utilizar un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se fijan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se fijan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Habitualmente se utilizan los parámetros por defecto del programa, o pueden fijarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades o similitudes de secuencia para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

- Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera de entre varias posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo que consiste de entre 20 y 600, habitualmente de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200, más habitualmente de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras la alineación óptima de las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1970), mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988), mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (por ejemplo GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).
- Los algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales han sido descritos en Altschul *et al.* (Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977), y en Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990), respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST se encuentra disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar las parejas de secuencias de alta puntuación (PAP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta que corresponden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo estando alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *in vivo*). Estos resultados iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas de PAP más largas que las contengan. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de premio para una pareja de residuos correspondientes, siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no correspondientes, siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene en el caso de que: la puntuación acumulada de alineación caiga en una cantidad X respecto al valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada vaya a cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuaciones negativas, o se alcance el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra de 3 y un valor esperado (E) de 10, y la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) alineaciones (B) de 50, valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.
- El algoritmo BLAST realiza además un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produzca por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia en el caso de que la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo y el ácido nucleico de referencia sea inferior a aproximadamente 0,2, típicamente inferior a aproximadamente 0,01, y más típicamente inferior a aproximadamente 0,001.
- La expresión "discriminación de no correspondencias" se refiere a la capacidad de un biocatalizador (por ejemplo un enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similar) de distinguir una secuencia totalmente complementaria de una secuencia que contiene no correspondencias, durante la extensión de un ácido nucleico (por ejemplo un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente del molde mediante la unión (por ejemplo covalentemente) de uno o más nucleótidos al ácido nucleico. La expresión "discriminación de no correspondencias 3'" se refiere a la capacidad de un biocatalizador de distinguir una secuencia totalmente complementaria de una secuencia (casi complementaria) que contiene no correspondencias en la que el ácido nucleico que debe extenderse (por ejemplo un cebador u otro oligonucleótido) presenta una no correspondencia en el extremo 3'-terminal del ácido nucleico en comparación con el molde con el que se hibrida el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que debe extenderse comprende una no correspondencia en el extremo 3' respecto a la secuencia totalmente complementaria. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que debe extenderse comprende una no correspondencia en la penúltima posición (N-1) 3' y/o en la posición N-2 respecto a la secuencia totalmente complementaria.
- La expresión "valor Cp" o valor de "punto de cruce" se refiere a un valor que permite la cuantificación de los ácidos nucleicos diana de entrada. El valor Cp puede determinarse según 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, nº 2, febrero de 2005, páginas 287-293). En el método de

la segunda derivada, un valor de Cp corresponde al primer pico de una curva de segunda derivada. Este pico corresponde al inicio de una fase log-lineal. El método de segunda derivada calcula un valor de segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia en tiempo real y únicamente se obtiene un valor. El método de Cp original se basa en una aproximación diferenciable definida localmente de los valores de intensidad, por ejemplo mediante una función polinómica. A continuación se calcula la tercera derivada. El valor de Cp es la raíz más pequeña de la tercera derivada. El valor de Cp también puede determinarse utilizando el método de punto de ajuste, en el que se determina el valor de Cp como la intersección de una línea paralela a la línea umbral en la región log-lineal (Van Luu-The *et al.*, BioTechniques, vol. 38, nº 2, febrero de 2005, páginas 287-293). Estos cálculos pueden ser fácilmente realizados por cualquier experto en la materia.

La expresión "eficiencia de PCR" se refiere a una indicación de la eficiencia de amplificación ciclo a ciclo para el molde de cebador perfectamente correspondiente. La eficiencia de la PCR se calcula para cada condición utilizando la ecuación: Eficiencia de PCR (%) = $(10^{(-\text{pendiente})} - 1) \times 100$, en la que la pendiente se calcula mediante regresión lineal con log número de copia en el eje y Cp en el eje x.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0061]

La figura 1 ilustra una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del dominio de polimerasa de ADN polimerasas ejemplares de diversas especies de bacterias: *Thermus* especie Z05 (Z05) (SEC ID nº 12), *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID nº 13), *Thermus filiformis* (Tfi) (SEC ID nº 14), *Thermus flavus* (Tfl) (SEC ID nº 15), *Thermus* species Sps17 (Sps17) (SEC ID nº 16), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID nº 17), *Thermus caldophilus* (Tca) (SEC ID nº 18), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID nº 19), *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEC ID nº 20), *Thermosiphon africanus* (Taf) (SEC ID nº 21), *Deinococcus radiodurans* (Dra) (SEC ID nº 23), *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (SEC ID nº 24) y *Bacillus caldotenax* (Bca) (SEC ID nº 25). Además, las regiones polipeptídicas mostradas comprenden el motivo de aminoácidos K-L-X₁-X₂-T-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈ (SEC ID nº 26), las posiciones variables del cual se definen adicionalmente en la presente memoria. Este motivo se subraya en negrita para cada secuencia de polimerasa. Las posiciones de aminoácidos que pueden mutar según la presente invención se indican con un asterisco (*).

La figura 2 proporciona las identidades de secuencia entre los enzimas ADN polimerasa I siguientes: *Thermus sp.* ADN polimerasa Z05 (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN 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 *Thermosiphon africanus* (Taf); ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst) y ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca). (A) identidades de secuencia a lo largo del enzima polimerasa I entero (correspondiente a los aminoácidos 1 a 834 de Z05), y (B) identidades de secuencia a lo largo del subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420 a 834 de Z05.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona ADN polimerasas mejoradas en las que se han identificado uno o más aminoácidos en el dominio de polimerasa que mejoran una o más actividades o características de las polimerasas. Las ADN polimerasas de la invención son enzimas activos que presentan una actividad incrementada de discriminación de no correspondencias 3' (es decir, las polimerasas de la invención indicadas en la presente memoria es menos probable que extiendan cebadores no correspondientes con el molde en el extremo 3' del cebador o próximo al mismo) respecto a la forma no modificada de la polimerasa que de otro modo es idéntica excepto por la diferencia de aminoácido indicada en la presente memoria. Las ADN polimerasas resultan útiles en una diversidad de aplicaciones que implican la extensión de polinucleótidos o la amplificación de moldes polinucleótidos, incluyendo, por ejemplo, aplicaciones en estudios de ADN recombinante y diagnóstico médico de enfermedades.

Polimerasas de la invención

Se dan a conocer ADN polimerasas que pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente: Lys-Leu-X₁-X₂-Thr-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈ (también denominado en la presente memoria con el código de una letra: K-L-X₁-X₂-T-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈), en el que:

- X₁ es Lys (K), Arg (R) o Gln (Q),
- X₂ es Ser (S), Asn (N) o Gly (G),
- X₃ es cualquier aminoácido diferente de Tyr (Y),
- X₄ es Val (V), Ile (I) o Leu (L),
- X₅ es Asp (D) o Glu (E),

X₆ es Pro (P), Ala (A), Thr (T), Ser (S) o Gly (G),
 X₇ es Leu (L) o Ile (I) y
 X₈ es Pro (P) o Leu (L) (SEC ID n° 8).

5 Se da a conocer además que X₃ se selecciona de entre G, A, L, M, W, P, S, T, F, C, N, Q, D, E, K, R, V, I or H (SEC ID n° 42).

Se da a conocer además que las ADN polimerasas pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente (correspondiente a *Thermus* y *Thermotoga*):

10 Lys-Leu-Lys-X₂-Thr-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Pro (también denominado en la presente memoria en el código de una letra como K-L-K-X₂-T-X₃-X₄-D-X₆-L-P), en el que:

X₂ es Asn (N) o Ser (S),
 X₃ es cualquier aminoácido diferente de Tyr (Y),
 X₄ es Val (V) o Ile (I), y

15 X₆ es Pro (P) o Ala (A) (SEC ID n° 9).

Se da a conocer además que las ADN polimerasas pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

Lys-Leu-Lys-X₂-Thr-X₃-X₄-Asp-Pro-Leu-Pro (también denominado en la presente memoria en el código de una letra: K-L-K-X₂-T-X₃-X₄-D-P-L-P), en el que:

20 X₂ es Asn (N) o Ser (S),
 X₃ es cualquier aminoácido diferente de Tyr (Y), y
 X₄ es Val (V) o Ile (I) (SEC ID n° 10).

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la invención pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

25 Lys-Leu-Lys-X₂-Thr-X₃-X₄-Asp-Pro-Leu-Pro (también denominado en la presente memoria en el código de una letra: K-L-K-X₂-T-X₃-X₄-D-P-L-P), en el que:

X₂ es Asn (N) o Ser (S),
 X₃ es Cys (C) o Asn (N), y

30 X₄ es Val (V) o Ile (I) (SEC ID n° 11).

Este motivo se encuentra presente en el dominio de "dedos" de muchas ADN polimerasas dependientes de ADN de familia A, particularmente las ADN polimerasas termoestables de bacterias termofílicas (Li *et al.*, EMBO J. 17:7514-7525, 1998). Por ejemplo, la figura 1 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos que comprende la secuencia nativa correspondiente al motivo anteriormente indicado en ADN polimerasas de varias especies de bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus stearothermophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermosiphon africanus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neopolitana*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus* sp. Sps17, *Thermus* sp. Z05 y *Thermus thermophilus*. Tal como se muestra, el motivo de SEC ID n° 8 (excepto en el que X₃ es Y) se encuentra presente en cada una de dichas polimerasas, indicando una función conservada de esta región de la polimerasa. La figura 2 proporciona identidades de secuencia entre dichas ADN polimerasas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en algunas realizaciones se da a conocer una polimerasa que comprende SEC ID n°8, 9, 10 o 11 (por ejemplo en la que X₃ se selecciona de entre G, A, L, M, W, P, S, T, F, C, N, Q, D, E, K, R, V, I o H), que presenta la actividad y/o las características mejoradas indicadas en la presente memoria, y en la que la ADN polimerasa de otro modo es una ADN polimerasa de tipo salvaje o natural, tal como, por ejemplo, una polimerasa de cualquiera de las especies de bacterias termofílicas listadas anteriormente, o es sustancialmente idéntica a dicha ADN polimerasa de tipo salvaje o natural. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa tal como se da a conocer comprende SEC ID n° 8, 9, 10 o 11 y es idéntica por lo menos al 80%, 85%, 90% o 95% respecto 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 una especie del género *Thermus*. Se da a conocer además que la polimerasa no modificada procede de una especie termofílica de un género diferente de *Thermus*, por ejemplo de *Thermotoga*. Se encuentran disponibles las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos completa para numerosas ADN polimerasas termoestables. Las secuencias de cada una de las polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID n°), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID n° 6), *Thermus* species Z05 (SEC ID n° 1), *Thermus* species Sps17 (SEC ID n° 5), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID n° 38) y *Thermosiphon africanus* (Taf) (SEC ID n° 37) han sido publicadas en la solicitud publicada de patente internacional PCT n° WO 92/06200. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermus flavus* (SEC ID n° 4) ha sido publicada 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 acceso U62584. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* puede recuperarse del depósito n° 42380 de la ATCC utilizando, por ejemplo, los métodos proporcionados en la patente US n° 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la Tabla 1. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (SEC ID n° 39) es de la base de datos de patentes GeneSeq n° R98144 y del documento n° PCT WO 97/09451. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Bacillus caldotenax* (SEC ID n° 41) se describe en, por ejemplo, Uemori *et al.* (J Biochem (Tokyo) 113(3):401-410, 1993; ver también el n° de acceso de la base de datos Swiss-Prot Q04957 y los n° de acceso de GenBank D12982 y

BAA02361). Los ejemplos de formas no modificadas de ADN polimerasas que pueden modificarse tal como se indica en la presente memoria también se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 6.228.628, nº 6.346.379, nº 7.030.220, nº 6.881.559, nº 6.794.177 y nº 6.468.775, y las solicitudes de patente US nº 20040005599; 20020012970; 20060078928 y 20040115639. También se proporcionan secuencias representativas de polimerasas de longitud completa en el listado de secuencias.

En algunas realizaciones, la polimerasa de la invención, además de presentar un dominio de polimerasa que comprende SEC ID nº 8, 9, 10 o 11, también comprende un dominio de nucleasa (por ejemplo correspondiente a las posiciones 1 a 291 de Z05).

Se da a conocer además 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 en, por ejemplo, la patente US nº 6.228.628. Resultan particularmente adecuadas las ADN polimerasas de familia CS quiméricas, que incluyen las polimerasas CS5 (SEC ID nº 29) y CS6 (SEC ID nº 30) y Variantes de las mismas que presentan una identidad o similitud de secuencia sustancial con la SEC ID nº 29 o la SEC ID nº 30 (típicamente una identidad de secuencia de por lo menos 80%, más típicamente de por lo menos 90% y todavía más típicamente de por lo menos 95%) y de esta manera pueden modificarse para contener SEC ID nº 8. Las ADN polimerasas CS5 y CS6 son enzimas quiméricas derivadas de las ADN polimerasas de *Thermus* sp. Z05 y de *Thermotoga maritima* (*Tma*). Comprenden el dominio N-terminal de nucleasa 5' del enzima de *Thermus* y la exonucleasa 3'-5' C-terminal y los dominios de polimerasa del enzima *Tma*. Estos enzimas presentan una actividad de transcriptasa inversa eficiente, pueden extender cebadores que contienen análogos de nucleótidos y pueden utilizarse dNTP, dUTP, dITP alfa-fosforotioato y también dNTP marcados con pigmentos de la familia de la fluoresceína y de la familia de la cianina. Las polimerasas CS5 y CS6 también son enzimas de PCR activados por Mg²⁺ eficientes. Las polimerasas quiméricas CS5 y CS6 se describen adicionalmente en, por ejemplo, la solicitud publicada de patente US nº 2004/0005599.

En algunas realizaciones, la polimerasa de la invención comprende SEC ID nº 8, 9, 10 o 11 y comprende además uno o más cambios de aminoácidos adicionales (por ejemplo la sustitución, adición o delección de aminoácidos) respecto a una polimerasa nativa. En algunas realizaciones, dichas polimerasas contienen el motivo de aminoácidos de SEC ID nº 8 (o un motivo de SEC ID nº 9, 10 o 11) y comprenden además el motivo de aminoácidos de SEC ID nº 27 (correspondiente a la mutación D580X de Z05 (SEC ID nº 1) siguiente:

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 diferente de D o E (SEC ID nº 27).

La mutación caracterizada por SEC ID nº 27 se comenta en mayor detalle en, por ejemplo, la publicación de patente US nº 2009/0148891. En algunas realizaciones, dichas polimerasas Variantes funcionales típicamente presentan una identidad o similitud de secuencia sustancial con la polimerasa de tipo salvaje o natural (por ejemplo SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 39, 40, 41, 42, 43 o 44), típicamente una identidad de secuencia de por lo menos 80%, más típicamente de por lo menos 90% y todavía más típicamente de por lo menos 95%.

En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición X₃ se sustituye con un aminoácido tal como se indica en SEC ID nº 8, 9, 10 o 11, y el aminoácido en la posición X₈ se sustituye por un aminoácido tal como se indica en SEC ID nº 27. De esta manera, en algunas realizaciones, el aminoácido en la posición X₃ es cualquier aminoácido diferente de Tyr (Y) y el aminoácido en la posición X₈ es cualquier aminoácido diferente de Asp (D) o Glu (E). En algunas realizaciones, entre las sustituciones de aminoácidos se 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 nº 27. En determinadas realizaciones, entre las sustituciones de aminoácidos se incluyen independientemente cisteína (C) o asparagina (N) en la posición X₃ y glicina (G) en la posición X₈. Pueden determinarse otras u otras sustituciones de aminoácidos adecuadas en uno o más de los sitios identificados, utilizando, por ejemplo, métodos de mutagénesis dirigida a sitio y determinación del rendimiento de extensión de polinucleótido en ensayos descritos adicionalmente en la presente memoria o de otro modo conocidos por el experto en la materia.

Debido a que la longitud exacta de las ADN polimerasas varía, las posiciones aminoácidas exactas correspondientes a cada uno de X₃ y X₈ pueden variar dependiendo de la polimerasa particular utilizada. Los programas de alineación de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos se encuentran disponibles fácilmente (ver, por ejemplo, los indicados *supra*) y, dados los motivos particulares identificados en la presente memoria, sirven para ayudar en la identificación de los aminoácidos exactos (y codones correspondientes) para la modificación según la presente invención. Las posiciones correspondientes a cada uno de X₃ y X₈ se muestran en la Tabla 1 de ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas y ADN polimerasas termoestables de especies termofílicas ejemplares.

Tabla 1. Posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de motivo X₃ (por ejemplo de SEC ID nº 8, 9, 10 y 11) y X₈ (de SEC ID nº 27) en las polimerasas ejemplares.

Organismo o secuencia quimérica	Posición de aminoácido	
	X3	X8 (de SEC ID nº 27).
Consenso (SEC ID nº)	X3	X8 (de SEC ID nº 27).
<i>T. thermophilus</i> (6)	547	580
<i>T. caldophilus</i> (7)	547	580
<i>T. sp. Z05</i> (1)	547	580
<i>T. aquaticus</i> (2)	545	578
<i>T. flavus</i> (4)	544	577
<i>T. filiformis</i> (3)	543	576
<i>T. sp. Sps17</i> (5)	543	576
<i>T. maritima</i> (38)	607	640
<i>T. neapolitana</i> (39)	607	640
<i>T. africanus</i> (37)	606	639
<i>B. caldotenax</i> (41)	588	621
<i>B. stearothermophilus</i> (40)	587	620
CS5 (29)	607	640
CS6 (30)	607	640

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa mutante de la presente invención se deriva de la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (SEC ID nº 1) o una VARIANTEe de la misma (por ejemplo D580G o similar). Tal como se ha indicado anteriormente, en la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp., la posición X₃ corresponde a la tirosina (Y) en la posición 547 y la posición X₈ corresponde al aspartato (D) en la posición 580. De esta manera, en determinadas variaciones de la invención, la polimerasa mutante comprende por lo menos una sustitución de aminoácido, respecto a la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. en Y547 y D580. De esta manera, típicamente el aminoácido en la posición Y547 no es Y. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 547 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, N, Q, D, E, K, R o H. En determinadas realizaciones, el residuo aminoácido en la posición Y547 es C o N. Los residuos de aminoácidos en la posición D580 pueden seleccionarse de entre leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (R) y lisina (K). En determinadas realizaciones, el residuo aminoácido en la posición D580 es G.

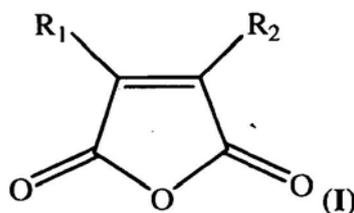
En algunas realizaciones, la ADN polimerasa Z05 comprende además sustituciones de aminoácidos adicionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 475 de SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de E. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 475 de SEC ID nº 1 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, N, Q, D, Y, K, R o H. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 475 de SEC ID nº 1 es D. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 632 de SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de R. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 632 de SEC ID nº 1 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, N, Q, D, Y, K, E o H. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 632 de SEC ID nº 1 es S.

Entre las ADN polimerasas Z05 de *Thermus* sp. mutantes se incluyen las que comprenden la sustitución o sustituciones de aminoácidos Y547C o Y547N en combinación con E475D, R632S y/o D580G. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos Y547C y D580G, o Y547N y D580G. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos (a) Y547C, E475D y D580G, o (b) Y547N, E475D y D580G. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos (a) Y547C, R632S y D580G, o (b) Y547N, R632S y D580G. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos (a) Y547C, E475D y R632S, o (b) Y547N, E475D y R632S. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos (a) Y547C, E475D, R632S y D580G, o (b) Y547N, E475D, R632S y D580G.

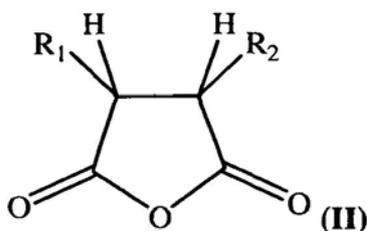
En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID nº 1 es un aminoácido que presenta una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo G, A, L, M, W, P, F, C, V o I) o una cadena lateral sin carga polar (por ejemplo N, Q, H, S o T) a pH neutro (por ejemplo aproximadamente 7,4). En algunas realizaciones, la ADN polimerasa de la invención se deriva de una especie de *Thermus* y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID nº 1 es un aminoácido que presenta una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo G, A, L, M, W, P, F, C, V o I) a pH neutro. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa de la invención se deriva de una especie de *Thermus* y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID nº 1 es un aminoácido que presenta una cadena lateral sin carga polar (diferente de Y, por ejemplo N, Q, H, S o T) a pH neutro. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID nº 1 que presenta una cadena lateral sin carga no polar es C. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 547 de SEC ID nº 1 que presenta una cadena lateral sin carga polar es S.

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la presente invención también pueden incluir otra u otras modificaciones no por sustitución. Entre dichas modificaciones pueden incluirse, por ejemplo, modificaciones covalentes que es conocido de la técnica que confieren una ventaja adicional en aplicaciones que comprenden la extensión de polinucleótidos. Por ejemplo, en determinadas 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 las aplicaciones de inicio en caliente tales como, por ejemplo, diversas técnicas de PCR de inicio en caliente. Los reactivos modificadores térmicamente reversibles que pueden utilizarse de acuerdo con las ADN polimerasas mutantes de la presente invención se describen en, por ejemplo, la patente US nº 5.773.258, de Birch *et al.*

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



en la que R₁ y R₂ son hidrógenos o radicales orgánicos, que pueden estar unidos, o que presenta la fórmula II a continuación:



en la que R₁ y R₂ son radicales orgánicos, que pueden encontrarse unidos, y los hidrógenos se encuentran en *cis*, esencialmente tal como se indica en Birch *et al.*, *supra*.

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 salvaje o una VARIANTE correspondiente a partir de la que se deriva la polimerasa de la invención), tal como mediante la utilización de técnicas comúnmente denominadas mutagénesis dirigida a sitio. Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la forma no modificada de la polimerasa pueden mutarse mediante una diversidad de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky editores, 1995, Academic Press, San Diego, CA), 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).

A título de ejemplo no limitativo, el sistema de dos cebadores, utilizado en el kit de mutagénesis dirigida a sitio Transformer de Clontech, puede utilizarse para introducir mutantes dirigidos a sitio en un polinucleótido codificante de una forma no modificada de la polimerasa. Tras la desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores con el plásmido: uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida a sitio deseada; el otro contiene una mutación en otro punto en el plásmido que resulta en la eliminación de un sitio de restricción. A continuación, se lleva a cabo la síntesis de segunda cadena, ligando estrechamente dichas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de *E. coli*. Se aísla el ADN plasmídico a partir de las bacterias transformadas, cortadas con el enzima de restricción relevante (linearizando de esta manera los plásmidos no mutados) y después se transforma nuevamente en *E. coli*. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin la necesidad de subclonación o la generación de fagémidos de cadena sencilla. El ligamiento estrecho de las dos mutaciones y la posterior linearización de plásmidos no mutados resulta en una elevada eficiencia de mutación y permite un cribado mínimo. Tras la síntesis del cebador inicial de sitio de restricción, este método requiere la utilización de únicamente un nuevo tipo de cebador por cada sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, puede sintetizarse un juego de cebadores oligonucleótidos "diseñados degenerados" con el fin de introducir todas las mutaciones deseadas en un sitio dado simultáneamente. Los transformantes pueden cribarse mediante secuenciación del ADN plasmídico pasando por la región mutagenizada con el fin de identificar y separar los clones mutantes. Cada ADN mutante

seguidamente puede cortarse y analizarse mediante electroforesis, tal como, por ejemplo, en un gel Mutation Detection Enhancement gel [gel de detección mejorada de mutaciones] (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) para confirmar que no se han producido otras alteraciones en la secuencia (mediante comparación del desplazamiento de las bandas con el control no mutagenizado). Alternativamente, puede secuenciarse la región de ADN entera para confirmar que no se han producido sucesos de mutación adicionales en el exterior de la región diana.

Los dúplex mutantes verificados en vectores de sobreexpresión pET (u otro) pueden utilizarse para transformar *E. coli*, tal como, por ejemplo, la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, para la producción de nivel elevado de la proteína mutante y la purificación mediante protocolos estándares. El método de mapeado FAB-MS, por ejemplo, puede utilizarse para comprobar rápidamente la fidelidad de la expresión del mutante. Esta técnica permite la secuenciación de segmentos de toda la proteína y proporciona la confianza necesaria en la asignación de las secuencias. En un experimento de mapeado de este tipo, se digirió la proteína con una proteasa (la elección dependerá de la región específica que debe modificarse, ya que este segmento es de gran interés y el mapa restante debería ser idéntico al mapa de la proteína no mutagenizada). El juego de fragmentos cortables se fracciona mediante, por ejemplo, HPLC microbore (de fase inversa o de intercambio iónico, nuevamente según la región específica que debe modificarse) para proporcionar varios péptidos en cada fracción y se determinan los pesos moleculares de los péptidos mediante métodos estándares, tales como FAB-EM. A continuación, se compara la masa determinada de cada fragmento con los pesos moleculares de los péptidos esperados de la digestión de la secuencia predicha y se determina rápidamente la corrección de la secuencia. Debido a que este enfoque de mutagénesis a la modificación de proteínas es dirigido, la secuenciación del péptido alterado no debería resultar necesaria en el caso de que los datos de la EM concuerden con la predicción. En caso de que resulte necesario para verificar un residuo modificado, puede utilizarse la EM/EM-CAD en tándem para secuenciar los péptidos de la mezcla en cuestión, o puede purificarse el péptido diana para degradación de Edman subtractiva o digestión con carboxipeptidasa Y, según la localización de la modificación.

Pueden generarse de diversas maneras ADN polimerasas mutantes con más de una sustitución de aminoácido. En el caso de los aminoácidos situados muy próximos entre sí en la cadena polipeptídica, pueden mutarse simultáneamente utilizando un oligonucleótido que codifica para la totalidad de las sustituciones de aminoácidos deseadas. Sin embargo, en el caso de que los aminoácidos se encuentren situados a cierta distancia unos de otros (separados por más de diez aminoácidos, por ejemplo), resulta más difícil generar un único oligonucleótido que codifique para todos los cambios deseados. En su lugar, puede utilizarse dos métodos alternativos. En el primer método, se genera un oligonucleótido separado para cada aminoácido que debe sustituirse. A continuación, los oligonucleótidos se hibridan con el ADN molde de cadena sencilla simultáneamente y la segunda cadena del ADN que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Un método alternativo incluye dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es tal como se ha indicado para los mutantes únicos: el ADN codificante de la polimerasa no modificada se utiliza para el molde, un oligonucleótido codificante de la primera o primeras sustituciones de aminoácidos deseadas se hibrida con dicho molde y seguidamente se genera la molécula de ADN heterodúplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado que se ha producido en la primera ronda de mutagénesis a modo de molde. De esta manera, este molde ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido codificante de la sustitución o sustituciones de aminoácidos deseadas adicionales seguidamente se hibrida con dicho molde y la cadena de ADN resultante ahora codifica mutaciones procedentes de tanto la primera como la segunda rondas de mutagénesis. Este ADN resultante puede utilizarse como molde en una tercera ronda de mutagénesis, y de esta manera sucesivamente. Alternativamente, puede utilizarse el método de mutagénesis multisitio de Seyfang y Jin (Anal. Biochem. 324:285-291, 2004).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, también se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de las ADN polimerasas de la presente invención (por ejemplo polimerasas que comprenden cualquiera de entre SEC ID n° 8, 9, 10 o 11). Utilizando un ácido nucleico de la presente invención, codificante de una ADN polimerasa de la invención, puede generarse una diversidad de vectores. Cualquier vector que contenga replicón y secuencias de control que se derivan de una especie compatible con la célula huésped puede utilizarse en la práctica de la invención. Generalmente, entre los vectores de expresión se incluyen regiones de ácidos nucleicos reguladoras de la transcripción y de la traducción operablemente ligadas con el ácido nucleico codificante de la ADN polimerasa mutante. La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariontes se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Además, el vector puede contener un elemento retrorregulador positivo (ERP) para incrementar la semivida del ARNm transcrito (ver Gelfand *et al.*, patente US n° 4.666.848). Las regiones de ácidos nucleicos reguladoras de transcripción y traducción generalmente resultarán apropiadas para la célula huésped utilizada para expresar la polimerasa. Se conocen de la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados, y secuencias reguladoras adecuadas, para una diversidad de células huésped. En general, entre las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluirse, por ejemplo, secuencias de promotor, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y parada transcripcional, secuencias de inicio y parada traduccional y secuencias intensificadoras o activadoras. En realizaciones típicas, entre las secuencias reguladoras se incluyen un promotor y secuencias de inicio y parada transcripcional. Entre los

5 vectores típicamente también se incluye una región policonectora que contiene varios sitios de restricción para la inserción de ADN foráneo. En determinadas realizaciones, se utilizan "señalizadores de fusión" para facilitar la purificación y, si se desea, la eliminación posterior de la secuencia de etiqueta/señalizadora, por ejemplo una "etiqueta de His". Sin embargo, éstas generalmente no resultan necesarias al purificar una proteína termoactiva y/o termoestable a partir de un huésped mesofílico (por ejemplo *E. coli*), en el que puede utilizarse una "etapa térmica". La construcción de vectores adecuados que contiene ADN codificante de secuencias replicación, secuencias reguladoras, genes de selección fenotípica y las polimerasas mutantes de interés se prepara utilizando procedimientos estándares de ADN recombinante. Los plásmidos aislados, vectores víricos y fragmentos de ADN se corta, adaptan y ligan entre sí en un orden específico para generar los vectores deseados, tal como es bien conocido de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, 2a ed. 1989)).

15 En determinadas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes de selección son bien conocidos de la técnica y varían según la célula huésped utilizada. Entre los genes de selección adecuados pueden incluirse, por ejemplo, genes codificantes de la resistencia a ampicilina y/o a tetraciclina, que permite que las células transformadas con estos vectores crezcan en presencia de estos antibióticos.

20 En un aspecto de la presente invención, se introduce en una célula un ácido nucleico codificante de una ADN polimerasa de la invención, solo o en combinación con un vector. Por "se introduce en" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se hace referencia a que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la integración, amplificación y/o expresión posteriores del ácido nucleico. El método de introducción está dictado en gran medida por el tipo celular diana. Entre los métodos ejemplares se incluyen la precipitación con CaPO₄, la fusión de liposomas, Lipofectin®, la electroporación, la infección vírica y similares.

25 En algunas realizaciones se utilizan procariotas como células huésped para las etapas de clonación iniciales de la presente invención. Resultan particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la producción de ADN molde de cadena sencilla utilizado para la mutagénesis dirigida a sitio, para el cribado de muchos mutantes simultáneamente y para la secuenciación de ADN de los mutantes generados. Entre las células huésped procarióticas adecuadas se incluyen *E. coli* K12 cepa 94 (ATCC nº 31.446), *E. coli* cepa W3110 (ATCC nº 27,325), *E. coli* K12 cepa DG116 (ATCC nº 53,606), *E. coli* X1776 (ATCC No. 31,537) y *E. coli* B; sin embargo, muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539 y muchas otras especies y géneros de procariotas, incluyendo bacilos tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacteriáceas tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas* pueden ser utilizados como huéspedes. Las células huésped procarióticas u otras células huésped con paredes celulares rígidas se transforman típicamente utilizando el método de cloruro de calcio tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *in vivo*. Alternativamente, puede utilizarse la electroporación para la transformación de estas células. Las técnicas de transformación de procariotas se describen en, por ejemplo, Dower, en Genetic Engineering, Principles and Methods 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan *et al.*, Meth. Enzymol., 204:63, 1991. Entre los plásmidos utilizados típicamente para la transformación de *E. coli* se incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pUC18, pUC119 y Bluescript M13, la totalidad de los cuales se describe en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook *et al.*, *supra*. Sin embargo, también se encuentran disponibles otros muchos vectores adecuados.

45 En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la presente invención se producen mediante cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico codificante de la ADN polimerasa, bajo condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la ADN polimerasa. Los métodos de cultivo de células huésped transformadas bajo condiciones adecuadas para la expresión de proteínas son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *in vivo*). Entre las células huésped adecuadas para la producción de las polimerasas de vectores plasmídicos que contiene promotor pL lambda se incluyen *E. coli* cepa DG116 (ATCC nº 53606) (ver la patente US nº 5.079.352 y Lawyer F.C. *et al.*, PCR Methods and Applications 2:275-87, 1993). Tras la expresión, la polimerasa puede ser recolectada y aislada. Los métodos para purificar la ADN polimerasa termoestable se describen en, por ejemplo, Lawyer *et al.*, *in vivo*.

55 Tras la purificación, puede someterse a ensayo la discriminación de no correspondencias 3' de una ADN polimerasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se determina la actividad de discriminación de no correspondencias 3' mediante la comparación de la amplificación de una secuencia diana perfectamente correspondiente con el cebador, y la amplificación de una diana que presenta una no correspondencia de una sola base en el extremo 3' del cebador. La amplificación puede detectarse, por ejemplo, en tiempo real mediante la utilización de sondas TaqManTM. La capacidad de una polimerasa de distinguir entre las dos secuencias diana puede estimarse comparando las Cp de las dos reacciones. Opcionalmente, puede llevarse a cabo la amplificación simultánea de un segundo gen diana en cada pocillo y detectarse en un segundo canal óptico a modo de control. La expresión "valor de delta Cp" se refiere a la diferencia en valor entre la Cp asociada al molde con no correspondencias menos la Cp de la diana correspondiente (ver, por ejemplo, la sección de Ejemplos). En algunas realizaciones, las polimerasas mejoradas de la invención presentan un valor de delta Cp de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5 o más en comparación con una polimerasa de control de otro modo idéntica que presenta un aminoácido nativo (por ejemplo Y) en la posición X₃ de SEC ID nº

8. En algunas realizaciones, esta determinación se realiza con los materiales precisos y condiciones indicadas en los Ejemplos.

Métodos de la invención

5 Las ADN polimerasas mejoradas de la presente invención pueden utilizarse con cualquier fin en el que dicha actividad enzimática resulte necesaria o deseada. La ADN polimerasa mejorada puede ser una ADN polimerasa termoactiva o termoestable, tal como se indica en la presente memoria. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto de la invención, se proporcionan métodos de extensión de polinucleótidos, incluyendo la PCR, utilizando las polimerasas de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona una ADN polimerasa termoactiva que resulta útil para extender un molde de ARN o ADN en el caso de que la amplificación del ácido nucleico molde no resulte necesaria, por ejemplo en el caso de que se desee detectar inmediatamente la presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la invención proporciona una ADN polimerasa termoestable que resulta útil en el caso de que se desee extender y/o amplificar un ácido nucleico diana. Las condiciones adecuadas para la extensión de polinucleótidos son conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *in vivo*). Ver también Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (4a ed., John Wiley & Sons 1999). Generalmente se hibrida un cebador 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 nucleósidos trifosfato en un ambiente adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos al extremo 3' del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido complementario al ácido nucleico diana. El cebador puede incluir, por ejemplo, uno o más análogos de nucleótido. Además, los nucleósidos trifosfato 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 polinucleótido comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. Las condiciones adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos utilizando una ADN polimerasa y una pareja de cebadores también son conocidas de la técnica (por ejemplo los métodos de amplificación por PCR) (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *in vivo*; Ausubel *et al.*, *in vivo*; PCR Applications: Protocols for Functional Genomics (Innis *et al.*, editores, Academic Press 1999)).

En algunas realizaciones, la utilización de las presentes polimerasas, que proporcionan una discriminación incrementada de las no correspondencias 3', permite, por ejemplo, la detección de alelos raros. Por ejemplo, la fidelidad de la discriminación de no correspondencias 3' de una polimerasa particular determina su sensibilidad (capacidad de detectar con precisión cantidades reducidas de una secuencia diana en presencia de cantidades más grandes de una secuencia no diana diferente aunque relacionada). De esta manera, la discriminación incrementada de no correspondencias 3' resulta en una mayor sensibilidad para la detección de alelos raros. La detección de alelos raros resulta útil, por ejemplo, durante el cribado de biopsias u otras muestras para cambios genéticos raros, por ejemplo una células portadora de un alelo de cáncer en una masa de células normales.

En algunas realizaciones, las polimerasas mejoradas se utilizan para la extensión de polinucleótidos en el contexto de la PCR específica de alelo o la detección de polimorfismos de nucleótido único (PNU). Se describen métodos ejemplares de detección de PNU 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 de 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. Las técnicas ejemplares para la detección de alto rendimiento de PNU se describen en Marnellos, "High-throughput SNP analysis for genetic association studies", Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 6(3):317-21 (mayo de 2003). Entre los métodos de detección de PNU comunes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ensayos TaqMan, ensayos de baliza molecular, matrices de ácidos nucleicos, extensión de cebador específico de alelo, PCR específica de alelo, extensión de cebadores ordenados, ensayos homogéneos de extensión de cebadores, extensión de cebador con detección mediante espectrometría de masas, pirosecuenciación, extensión multiplex de cebadores ordenados en matrices génicas, ligamiento con amplificación de círculo rodante, ligamiento homogéneo, OLA (patente US nº 4.988.167), reacción multiplex de ligamiento ordenada sobre matrices génicas, polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción, ensayos de etiqueta de extensión de base única y el ensayo Invader. Dichos métodos pueden utilizarse en combinación con mecanismos de detección tales como, por ejemplo, la detección mediante luminiscencia o quimioluminiscencia, la detección de fluorescencia, la detección de fluorescencia resuelta en el tiempo, la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, la polarización de fluorescencia, la espectrometría de masas y la detección eléctrica.

La detección de múltiples alelos diferentes también puede llevarse a cabo utilizando reacciones multiplex, que permiten la detección de múltiples alelos diferentes en una sola reacción. En las reacciones multiplex, se utilizan dos o más cebadores específicos de alelo para extender y amplificar PNU o múltiples polimorfismos de nucleótidos o alelos. Se describen métodos ejemplares de detección multiplex de polimorfismos de nucleótidos únicos y múltiples en la publicación de patente US nº 2006/0172324.

Entre otros métodos para detectar productos de extensión o productos de amplificación utilizando las polimerasas mejoradas descritas en la presente memoria se incluyen la utilización de pigmentos de unión a nucleótidos de doble

cadena fluorescentes o pigmentos intercalantes de nucleótidos de doble cadena fluorescentes. Entre los ejemplos de pigmentos de unión a ADN de doble cadena fluorescentes se incluyen verde SYBR (Molecular Probes). Entre los ejemplos de pigmentos intercalantes de doble cadena fluorescentes se incluyen bromuro de etidio. Los pigmentos de unión a ADN de doble cadena pueden utilizarse conjuntamente con el análisis de curvas de fusión para medir los productos de extensión de cebadores y/o los productos de amplificación. El análisis de curvas de fusión puede llevarse a cabo 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 incorporado (SDS 2.1). Alternativamente, el análisis de curvas de fusión puede llevarse a cabo como un análisis de punto final. Se describen métodos ejemplares de análisis de punto de fusión en la publicación de patente US nº 2006/0172324.

En todavía otras realizaciones, las polimerasas de la invención se utilizan para la extensión de cebadores en el contexto de la secuenciación del ADN, el marcaje del ADN o el marcaje de productos de extensión de cebador. Por ejemplo, la secuenciación del ADN mediante el método de dideoxinucleótido de Sanger (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463, 1977) resulta mejorado por la presente invención para las polimerasas capaces de incorporar nucleótidos de terminación de cadena no convencionales. Los avances en el método básico de Sanger *et al.* 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 del ADN requiere la extensión de cebador dependiente de molde en presencia de análogos de base terminadores de cadena, resultando en una distribución de fragmentos parciales que posteriormente se separan según tamaño. El procedimiento de secuenciación dideoxi básico implica: (i) hibridar un cebador oligonucleótido, opcionalmente marcado, con un molde, (ii) extender el cebador con ADN polimerasa en cuatro reacciones separadas, conteniendo cada una una mezcla de dNTP no marcados y una cantidad limitante de un agente terminador de cadena tal como ddNTP, opcionalmente marcado, y (iii) resolver los cuatro conjuntos de productos de reacción en un gel de poli(acrilamida/urea) desnaturizante de alta resolución. Los productos de reacción pueden detectarse en el gel mediante autorradiografía o mediante detección de la fluorescencia, según el marcaje utilizado, y la imagen puede examinarse para inferir la secuencia de nucleótidos. Estos métodos utilizando ADN polimerasas tales como el fragmento Klenow de *E. coli* Pol I o una ADN polimerasa de T7 modificada.

La disponibilidad de las polimerasas termoestables, tales como la ADN polimerasa Taq, ha resultado en métodos mejorados de secuenciación con ADN polimerasa termoestable (ver Innis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9436, 1988) y modificaciones de los mismos denominados "secuenciación cíclica" 17:8889, 1989). De acuerdo con lo anterior, pueden utilizarse polimerasas termoestables de la presente invención conjuntamente con dichos métodos. Como alternativa a la secuenciación dideoxi básica, la secuenciación cíclica es una amplificación asimétrica lineal de secuencias diana complementarias a la secuencia del molde en presencia de terminadores de cadena. Un único ciclo produce una familia de productos de extensión de todas las posibles longitudes. Tras la desnaturalización del producto de reacción de extensión del ADN molde, se producen múltiples ciclos de hibridación de los cebadores y de extensión de los cebadores, en presencia de terminadores tales como los ddNTP. La secuenciación cíclica requiere menos ADN molde que la secuenciación de terminación de cadena convencional. Las ADN polimerasas termoestables presentan varias ventajas en la secuenciación cíclica: toleran las restrictivas temperaturas de hibridación que se requieren para la hibridación específica del cebador con las dianas de ácidos nucleicos, así como para tolerar los múltiples ciclos de desnaturalización a alta temperatura que se produce en cada ciclo, por ejemplo 90°C a 95°C. Por ello, la ADN polimerasa AMPLITAQ® y sus derivados y descendientes, por ejemplo la ADN polimerasa AmpliTaq CS y la ADN polimerasa AmpliTaq FS han sido incluidas en los kits de secuenciación cíclica Taq comercializados por compañías como Perkin-Elmer (Norwalk, CT) y Applied Biosystems (Foster City, CA).

Las polimerasas mejoradas encuentran utilidad en la secuenciación de 454 (Roche) (Margulies M. *et al.*, Nature 437:376-380, 2005). La secuenciación de 454 implica dos etapas. En la primera etapa, se rompe el ADN en fragmentos de aproximadamente 300 a 800 pares de bases y se generan extremos romos en los fragmentos. A continuación se ligan adaptadores oligonucleótidos a los extremos de los fragmentos. Los adaptadores sirven como cebadores para la amplificación y secuenciación de los fragmentos. Los fragmentos pueden unirse a perlas de captura de ADN, por ejemplo perlas recubiertas con estreptavidina, por ejemplo Adaptor B, que contiene la etiqueta 5'-biotina. Los fragmentos unidos a las perlas se amplifican por PCR en gotas de una emulsión de aceite en agua. El resultado son múltiples copias de fragmentos de ADN amplificados clonalmente sobre cada perla. En la segunda etapa, se capturan las perlas en pocillos (de un volumen de picolitros). Se lleva a cabo la pirosecuenciación de cada fragmento de ADN en paralelo. La adición de uno o más nucleótidos genera una señal de luz que se registra con una cámara CCD en un instrumento de secuenciación. La intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporado.

La pirosecuenciación utiliza el pirofosfato (PPi) que es liberado con la adición de un nucleótido. Se convierten los PPi en ATP con la ATP sulfurilasa en presencia de adenosín-5'-fosfosulfato. La luciferasa utiliza el ATP para convertir la luciferina en oxiluciferina, y esta reacción genera luz que se detecta y se analiza.

Entre las variaciones de los métodos de secuenciación de terminación de cadena se incluyen la secuenciación de pigmento-cebador y la secuenciación de pigmento-terminador. En la secuenciación de pigmento-cebador, los terminadores ddNTP no se encuentran marcados y se utiliza un cebador marcado para detectar los productos de extensión (Smith *et al.*, Nature 32:674-679, 1986). En la secuenciación del ADN de pigmento-terminador, se utiliza

una ADN polimerasa para incorporar los dNTP y ddNTP marcados fluorescentemente en el extremo de un cebador de ADN (Lee *et al.*, Nuc. Acids Res. 20:2471, 1992). Este procedimiento ofrece la ventaja de que no resulta necesario sintetizar cebadores marcados con pigmento. Además, las reacciones de terminador de pigmento resultan más convenientes en el aspecto de que las cuatro reacciones pueden llevarse a cabo en el mismo tubo.

Los métodos de pigmento-cebador y de pigmento-terminador pueden automatizarse utilizando un instrumento de secuenciación automática producido por Applied Biosystems (Foster City, CA) (patente US nº 5.171.534). Al utilizar el instrumento, la mezcla de reacción de secuenciación completada se fracciona en un gel de poliacrilamida desnaturalizante o capilares montados en el instrumento. Un láser en el fondo del instrumento detecta los productos fluorescentes al separarlos electroforéticamente según su tamaño a través del gel.

Se utilizan comúnmente dos tipos de pigmento fluorescente para marcar los terminadores utilizados para la secuenciación de pigmento-terminador cargados negativamente y pigmentos fluorescentes zwitteriónicos. Entre los pigmentos fluorescentes con carga negativa se incluyen los de las familias de la fluoresceína y de BODIPY. Los pigmentos BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) se han descrito en la publicación de patente internacional nº WO 97/00967. Entre los pigmentos fluorescentes zwitteriónicos se incluyen los de la familia de la rodamina. Los kits de secuenciación cíclica disponibles comercialmente utilizan terminadores marcados con derivados de la rodamina. Sin embargo, los terminadores marcados con rodamina son bastante caros y el producto debe separarse del pigmento no incorporado-ddNTP antes de la carga en el gel ya que comigran con los productos de secuenciación. Los terminadores de la familia del pigmento rodamina aparentemente estabilizan las estructuras de horquilla en las regiones ricas en GC, lo que provoca que los productos migren de manera anómala. Lo anterior puede implicar la utilización de dITP, que relaja la estructura secundaria aunque también afecta a la eficiencia de incorporación del terminador.

En contraste, los terminadores marcados con fluoresceína eliminan la etapa de separación previa a la carga del gel ya que presentan una carga negativa neta mayor y migran más rápido que los productos de secuenciación. Además, los productos de secuenciación marcados con fluoresceína presentan una mejor migración electroforética que los productos de secuenciación marcados con rodamina. Aunque la ADN polimerasa Taq de tipo salvaje no incorpora eficientemente los terminadores marcados con los pigmentos de la familia de la fluoresceína, ello puede conseguirse ahora eficientemente mediante la utilización de los enzimas modificados tal como se describen en la solicitud publicada de patente US nº 2002/0142333. De acuerdo con lo anterior, las modificaciones tal como se indican en el documento nº US 2002/0142333 pueden utilizarse en el contexto de la presente invención para producir polimerasas termoestables que incorporan pigmento de la familia de la fluoresceína, que presentan tasas de extensión de cebador mejoradas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la ADN polimerasa no modificada según la presente invención es una polimerasa termoestable modificada tal como se indica en el documento nº US 2002/0142333 y que presenta el motivo indicado en la SEC ID nº 8 (o un motivo de SEC ID nº 9, 10 o 11) y opcionalmente el motivo de SEC ID nº 27.

Entre otros formatos ejemplares de secuenciación de ácidos nucleicos en los que las ADN polimerasas mutantes de la invención pueden utilizarse se incluyen los que implican compuestos terminadores que incluyen análogos 2'-PO4 de ribonucleótidos (ver, por ejemplo, las solicitudes publicadas de patente US nº 2005/0037991 y nº 2005/0037398, y la solicitud de patente US nº 12/174,488).

Kits

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan kits para la utilización en métodos de extensión de cebador descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit se encuentra compartimentalizado para facilitar el uso y contiene por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de la invención que presenta una discriminación de no correspondencias 3' incrementada según la presente invención. También puede incluirse uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualesquiera reactivos u otros elementos reconocidos por el experto en la materia para la utilización en procedimientos de extensión de cebador según los métodos descritos anteriormente, incluyendo reactivos para la utilización en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de marcaje de ADN. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el kit incluye además un recipiente que proporcionar un cebador de sentido 5' hibridable, bajo condiciones de extensión de cebador, a un polinucleótido molde predeterminado, o una pareja de cebadores que comprende el cebador de 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 totalmente complementarios a polimorfismos de nucleótido único o a polimorfismos de múltiples nucleótidos, en el que los cebadores resultan útiles para reacciones multiplex, tal como se ha indicado anteriormente. En otras variaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan nucleósidos trifosfato (convencionales y/o no convencionales). En realizaciones específicas, el kit incluye dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP-pigmento de la familia de la fluoresceína o de la familia de la cianina. En todavía otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebador. En algunas realizaciones, el kit incluye una o más sondas marcadas o no marcadas. Entre los ejemplos de sondas se incluyen sondas FRET (transferencia de energía de resonancia de

fluorescencia) de marcaje dual y sondas de baliza molecular. En otra realización, el kit contiene un aptámero, por ejemplo para ensayos de PCR de inicio en caliente.

Mezclas de reacción

5 En otro aspecto de la presente invención se proporcionan mezclas de reacción que comprenden las polimerasas con actividad incrementada de discriminación de no correspondencias 3', tal como se describe en la presente memoria. Las mezclas de reacción pueden comprender además reactivos para la utilización en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación del ADN o procedimientos de marcaje del ADN. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebadores. Las mezclas de reacción pueden contener además un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos cebadores o de sonda, nucleósidos trifosfato (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos marcados, nucleótidos no convencionales), sales (por ejemplo Mn^{2+} , Mg^{2+}) y marcajes (por ejemplo fluoróforos). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además pigmentos de unión a ADN de doble cadena, tales como verde SYBR o pigmentos intercalantes de ADN de doble cadena, tales como bromuro de etidio. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción contienen un cebador de sentido 5' hibridable, bajo condiciones de extensión de cebador, a un polinucleótido molde predeterminado, o una pareja de cebadores que comprende el cebador de sentido 5' y un cebador antisentido 3' correspondiente. En determinadas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una sonda de hidrólisis FRET fluorogénica para la detección de ácidos nucleicos de molde amplificadas, por ejemplo una sonda Taqman®. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene dos o más cebadores que son totalmente complementarios a polimorfismos de nucleótido único o a polimorfismos de múltiples nucleótidos. En algunas realizaciones las mezclas de reacción contienen dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP-pigmento de la familia de la fluoresceína o de la familia de la cianina.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se ofrecen a título ilustrativo, aunque no limitativo, de la invención reivindicada.

Ejemplo 1: identificación de ADN polimerasas mutantes con discriminación incrementada de no correspondencias 3'

La ADN polimerasa de control del presente ejemplo es una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. de SEC ID nº 1 excepto en que el aminoácido en la posición 580 es glicina (por ejemplo una sustitución D580G) (en lo sucesivo polimerasa Z05 D580G).

Se identificaron las mutaciones en la polimerasa Z05 D580G que proporcionaban una capacidad reducida de extender un cebador oligonucleótido con una no correspondencia 3' respecto a un molde. Brevemente, las etapas en este procedimiento de cribado incluían la generación de una biblioteca, la expresión y purificación parcial de los enzimas mutantes, el cribado de los enzimas para la propiedad deseada, la secuenciación del ADN, la purificación clonal y la caracterización adicional de los mutantes candidatos seleccionados. Se describe en mayor detalle cada una de estas etapas a continuación.

Generación de biblioteca clonal: Un ácido nucleico codificante del dominio de polimerasa de la ADN polimerasa Z05 D580G se sometió a PCR con tendencia a errores (mutagénica) entre los sitios de restricción Bsp I y Bgl II de un plásmido que incluía esta secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia amplificada se proporciona como SEC ID nº 33. Los cebadores utilizados para ello se proporcionan a continuación: Cebador directo: 5'-CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3' (SEC ID nº 31) y

Cebador inverso: 5'-ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTA-3' (SEC ID nº 32).

Se llevó a cabo una PCR utilizando un abanico de concentraciones de Mg^{2+} de entre 1,8 y 3,6 mM con el fin de generar bibliotecas con un rango de tasas de mutación. Las condiciones de tampón fueron bicina 50 mM, pH 8,2, KOAc 115 mM, glicerol al 8% p/v y 0,2 mM de cada dNTP. Se utilizó el enzima de PCR de inicio en caliente GeneAmp® AccuRT a razón de 0,15 U/ml. Partiendo de 5×10^5 copias de ADN plasmídico Z05 D580G linearizado por cada volumen de reacción de 50 μ l, las reacciones se desnaturalizaron utilizando una temperatura de 94°C durante 60 segundos, seguido de 30 ciclos de amplificación utilizando 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.

El amplicón resultante se purificó con un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) y se cortó con Bsp I y Bgl II y después se purificó nuevamente con un kit de purificación por PCR QIAquick. Se preparó un vector plasmídico Z05 D580G mediante corte con los mismos dos enzimas de restricción y con tratamiento con fosfatasa alcalina, recombinante (RAS, nº de cat. 03359123001) y se purificó con un kit de purificación por PCR QIAquick. El vector cortado y el inserto mutado se mezclaron en una proporción de 1:3 y se trataron con ADN ligasa de T4 durante 5 minutos a temperatura ambiente (kit NEB Quick Ligation™). Las ligaciones se purificaron con un kit de purificación por PCR QIAquick y se transformaron en una cepa huésped *E. coli* mediante electroporación.

Se sembraron alícuotas de los cultivos expresados en medio selectivo con ampicilina con el fin de determinar el número de transformantes únicos en cada transformación. Las transformaciones se almacenaron a una temperatura de entre -70°C y -80°C en presencia de glicerol como crioprotector.

5 A continuación, se extendió cada biblioteca sobre placas de agar selectivas con ampicilina de gran formato. Se transfirieron las colonias individuales a placas de 384 pocillos que contenían caldo de Luria 2X con ampicilina y glicerol al 10% p/v utilizando un recolector de colonias automático (QPix2, Genetic Ltd.). Estas placas se incubaron durante la noche a 30°C para permitir el crecimiento de los cultivos y después se almacenaron a una temperatura de entre -70°C y -80°C. Se añadió suficientemente poco glicerol al caldo Luria 2X para permitir el crecimiento del cultivo aunque suficiente para proporcionar crioprotección. Se prepararon varios miles de colonias a varios niveles de mutagénesis (Mg^{2+}) de esta manera, para su uso posterior.

15 *Preparación de biblioteca de extractos Parte 1 - Fermentación:* A partir de las bibliotecas clonales indicadas anteriormente, se preparó una biblioteca correspondiente de extractos parcialmente purificados adecuados para fines de cribado. La primera etapa de este procedimiento era preparar cultivos de expresión a pequeña escala de cada clon. Estos cultivos se cultivaron en formato de 96 pocillos; por lo tanto, había 4 placas de cultivo de expresión por cada placa de biblioteca de 384 pocillos. Se transfirieron 0,5 µl de cada pocillo de la placa de biblioteca clonal a un pocillo de una placa de inóculo de 96 pocillos, que contenían 150 µl de medio A (ver la Tabla 3, posteriormente).
 20 Esta placa de inóculo se agitó durante la noche a 1.150 rpm a 30°C en una placa incubadora/agitador iEMS (ThermoElectron). A continuación, dichos cultivos de inóculo se utilizaron para inocular el mismo medio, esta vez inoculando 20 µl en 250 µl de medio A en placas de 96 pocillos de gran formato (Nunc nº 267334). Estas placas se incubaron durante la noche a 37°C bajo agitación. El plásmido de expresión contenía elementos de control transcripcional que permiten la expresión a 37°C pero no a 30°C. Tras la incubación durante la noche, los cultivos expresaron la proteína del clon hasta típicamente 1-10% del total de proteínas celulares. Las células de estos cultivos se recolectaron mediante centrifugación. Estas células se congelaron (-20°C) o se procesaron inmediatamente, tal como se indica posteriormente.

Tabla 2. Medio A (esterilizado mediante filtración antes de la utilización)

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
Ácidos casamino	2,5 g/l
Glucosa	2 g/l
Tiamina·HCl	10 mg/l
Ampicilina	100 mg/l

30 *Preparación de biblioteca de extractos Parte 2 - Extracción:* Se resuspendieron los pellets celulares de la etapa de fermentación en 25 µl de tampón de lisis (Tabla 3, posteriormente) y se transfirieron a placas de termociclador de 384 pocillos y se sellaron. Observar que el tampón contenía lisozima para ayudar en la lisis celular y ADNasa para eliminar el ADN del extracto. Para lisar las células, las placas se incubaron a 37°C durante 15 minutos, se congelaron durante la noche a -20°C y se incubaron nuevamente a 37°C durante 15 minutos. Se añadió sulfato amónico (1,5 µl de una solución 2 M) y las placas se incubaron a 75°C durante 15 minutos con el fin de precipitar e inactivar las proteínas contaminantes, incluyendo las nucleasas añadidas exógenamente. Las placas se centrifugaron a 3.000xg durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a una nueva placa para termociclador de 384 pocillos. Estas placas de extractos se congelaron a -20°C para el uso posterior en los cribados.
 35 Cada pocillo contenía aproximadamente 0,5 a 3 mM del enzima polimerasa mutante de la biblioteca.

Tabla 3. Tampón de lisis

Componente	Concentración o porcentaje
Tris pH 7.5	50 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	6 mM
Tween 20	al 0,5% v/v
Lisozima (de polvos)	1 mg/ml
ADNasa I	0,05 unidades/µl

45 *Cribado de bibliotecas de extractos para tasa de extensión reducida de no correspondencias de cebador 3':* Se cribó la biblioteca de extractos mediante la comparación de la tasa de extensión de un cebador perfectamente correspondiente con un oligonucleótido molde frente a la tasa de extensión de un cebador con una no correspondencia G:T 3'.

Los extractos de enzima anteriormente indicados se diluyeron 10 veces para las reacciones de extensión de cebador mediante la combinación de 2,5 µl de extracto con 22,5 µl de un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y Tween-20 al 0,2% en una placa para termociclador de 384 pocillos, tapando y calentando durante 10 minutos a 90°C. Las reacciones de control con cebador de correspondencia perfecta combinaban 0,5 ml del extracto diluido con 15 µl de mezcla maestra en placas para PCR de 384 pocillos. Se realizó un seguimiento de la extensión del molde con cebadores cada 10 segundos en un ciclador térmico cinético modificado utilizando una cámara CCD (ver Watson, *in vivo*). La mezcla maestra contenía 50 nM de molde de cebador cebado, tricina 25 mM, pH 8,3, KOAc 100 mM, 0,6X Verde SYBR I, 200 mM de cada dNTP, 100 nM de aptámero y acetato de magnesio 2,5 mM. Con el fin de distinguir la fluorescencia derivada de la extensión de la fluorescencia de fondo, se incluyeron pocillos paralelos en el experimento en los que se había bloqueado la extensión de la cadena de cebador omitiendo los nucleótidos de la mezcla maestra de reacción. Las reacciones con el cebador no correspondiente 3' se llevaron a cabo tal como anteriormente excepto en que se añadieron 1,5 µl de extracto diluido a cada reacción y en que el acetato de manganeso 1,5 mM se sustituyó por acetato de magnesio. El incremento de la cantidad de extracto en tres veces y la utilización de manganeso como el metal activador provocan que la extensión de no correspondencias resulte más probable y, por lo tanto, mejoran la selectividad del cribado para aquellos enzimas con la capacidad más alta de discriminar contra la extensión de no correspondencias 3'.

Se cribaron aproximadamente 5.000 extractos mutantes utilizando el protocolo anteriormente indicado. Se seleccionaron aproximadamente 7% del pool original para el nuevo cribado basándose en un valor de extensión de cebador perfectamente correspondiente superior a un valor de corte arbitrario y la proporción entre la extensión de baja no correspondencia y perfecta correspondencia. Los pocillos de cultivo correspondientes a los mejores extractos se introdujeron en medio de crecimiento fresco y se cultivaron nuevamente para producir nuevas placas de cultivo que contenían los mejores mutantes, así como varios cultivos parentales que se utilizarían para la comparación. A continuación, se utilizaron estas placas de cultivo para preparar extractos frescos que se cribaron nuevamente para confirmar el fenotipo de cribado original. Las tasas de extensión de cebador para las reacciones con los cebadores de correspondencia 3' perfecta y no correspondiente 3' se calcularon como la pendiente del incremento de fluorescencia durante el tiempo para la parte lineal de la curva. La proporción entre la pendiente de extensión no correspondiente y la pendiente de la extensión perfectamente correspondiente se utilizó para ordenar y seleccionar los mejores candidatos. Los clones seleccionados del nuevo cribado, además de para la comparación el clon parental Z05 D580G, con sus genotipos y fenotipos respectivos, se incluyen en la tabla a continuación.

Tabla 4.

Enzima	Pendiente de correspondencia perfecta (CP)	Pendiente de no correspondencia (NC)	Pendiente NC / Pendiente CP
Z05 D580G	8,29	8,04	0,97
Z05 D580G Y547C	11,76	0,84	0,07
Z05 D580G E475D Y547N R632S	12,43	1,58	0,13

Ejemplo 2: amplificación de plásmido molde BRAF mutante en un fondo de molde genómico humano BRAF de tipo salvaje

La ADN polimerasa de control del presente ejemplo es una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. de SEC ID nº 1 excepto en que el aminoácido en la posición 580 es glicina (por ejemplo una sustitución D580G) (en lo sucesivo polimerasa Z05 D580G).

Se compararon Z05 D580G Y547C purificado y Z05 D580G E475D Y547N R632S con el enzima parental Z05 D580G en PCR TaqMan para la discriminación mejorada de una diana BRAF V600R mutante en un fondo de ADN genómico humano de tipo salvaje.

Se utilizaron cebadores que amplifican una región del gen BRAF humano y son perfectamente correspondientes de la diana en el caso de que dicha diana porte una mutación en el codón 600 de BRAF, V600K. Contra la diana BRAF de tipo salvaje, presente en el ADN genómico humano, el cebador selectivo de alelo resulta en una única no correspondencia A:C en el extremo 3'. El cebador común es perfectamente correspondiente con el gen BRAF, al igual que la secuencia de sonda, lo que permite la detección TaqMan en tiempo real de la amplificación. Cada reacción presentaba 10.000 copias (33 ng) de ADN genómico de línea celular humana de tipo salvaje o bien 10.000 o 100 copias de un plásmido linearizado que contenía la secuencia mutante BRAF V600R en un volumen final de 16 µl. Para considerar los diferentes óptimos salinos de los enzimas, se llevaron a cabo amplificaciones utilizando un rango de concentraciones de KCl de 25 a 130 mM. Las condiciones del tampón fueron Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, UNG 0,02 U/ml y 200 nM de aptámero. Los cebadores directo e inverso se encontraban a una concentración de 100 nM y la sonda, de 25 nM. Todas las ADN polimerasas se sometieron a ensayo a 20 nM y se añadió tampón de almacenamiento de enzima al 2% (v/v) (glicerol al 50% v/v, KCl 100 mM, Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,5%) a las reacciones. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico LightCycler 480 de Roche y se desnaturalizaron utilizando una temperatura de 95°C durante

60 segundos, seguido de 99 ciclos de amplificación, utilizando una temperatura de desnaturalización de 92°C durante 10 segundos y una temperatura de hibridación de 62°C durante 30 segundos.

5 Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, se calcularon los puntos de cruce ("Cp") mediante el método de cuant. abs./max. de 2a derivada y se calcularon los promedios de las Cp. Los valores promedio de Cp se muestran en la tabla, posteriormente, así como la eficiencia calculada de la PCR y los valores de factor de discriminación a la concentración de KCl para cada enzima que resultó en la Cp mutante de copia elevada más temprano. El valor de delta Cp de copia elevada es igual a la diferencia entre los valores promedio de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana genómica de tipo salvaje no correspondiente 3' y los valores promedio de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana plasmídica perfectamente correspondiente en un fondo de 10.000 copias de diana genómica de tipo salvaje no correspondiente 3'. Todas las reacciones presentaban un fondo de 10.000 copias de diana BRAF de tipo salvaje; por lo tanto, los Cp de las reacciones sin plásmido mutante representan la amplificación no específica del molde cebador no correspondiente y el límite de discriminación para ese enzima bajo la condición no sometida a ensayo. Z05 D580G Y547C y Z05 D580G E475D Y547N R632S mostraron una mejor discriminación que la Z05 D580G parental.

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

Enzima	KCL óptimo (mM)	0 copias plásmido mutante	1000 copias plásmido mutante	10,000 copias plásmido mutante	Eficiencia de la PCR (%)	Factor de discriminación	ΔCp de copia elevad
Z05 D580G	120	34,0	32,2	26,1	110	2,6	8
Z05 D580G Y547C	100	52,8	34,9	27,7	90	7,0	25
Z05 D580G E475D Y547N R632S	40	46,8	34,9	28,4	104	5,7	18

20 El presente ejemplo demuestra que los enzimas mutantes Y547C e Y547N presentan una detección mejorada de alelos raros comparado con el enzima parental de control, Z05 D580G.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria se proporcionan únicamente a título ilustrativo y que el experto en la materia concebirá diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

25 LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL

SEC ID nº 1 ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* (Z05)

MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPVQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVFDAKAPSPFRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
 AKKAEREGYEVRIILTADRDLYQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGEKALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
 DLPLEVDFARRREPDRGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 PEPMAELKALAAKKEGRVHRAKDPLAGLKDKEVRGLLAKDLAVLALREGLDLAPSDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGWTEAAHRALLAERLQQNLLERLKGEEKLLWLWYQEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRLDVAYLKALESLELAEERLLEEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPGLVHPRTRGLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNIPIRTPLGQIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFGVSPAVDPLMRRAAKTVNFGVLYGMSAHRLSQELAI PYEEAVA
 FIERFYQSFPKVRAWIEKTLLEGRKRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKSVREAAERMAFNMPVQ
 GTAADLMKMLAMVKLFPHLREMGARMLLQVHDELLLEAPQARAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGIGEDWLSAKG

30 SEC ID nº 2 ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDAVI
 VVFDKAPSRHEAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLLARLEVPGYEADDVLA
 SLAKAEKEGYEVRIILTADKDLYQLLSDRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRAL
 TGDESDNLPGVKIGIGEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRKPAIREKILAHMDDLKLSWDLAK
 VRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAFLEFGLSLLHEFGLLESFPALEEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 KEMPWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSA
 VLAHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELGL
 PAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTR
 FNQATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFIAEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFOEGRDIHTETASWMFGVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSQELAI PYEEAQAF
 IERYFQSFPKVRAWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKSVREAAERMAFNMPVQGT
 AADLMKMLAMVKLFPRLLEEMGARMLLQVHDELVLLEAPKERAEAVARLAKEVMEGVYPLAVPLEV
 EVGIGEDWLSAKE

SEC ID nº 3 ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)

MLPLLEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGEVAIVVF
 DAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVLRLEVPGFEADDVLA
 TLARKAEREGYEVRIILSADRDLYQLLSDRIHLLHPEGEVLTTPGWLQERYGLSPERWVEYRALV
 G DPSNLPGVPGIGEKTAALKLLKEWGSLEAILKNLDQVKPERVWEAIRNNLDKLQMSLELSRLR
 TDLPLEVDFAKRREP
 TGKGLKAFLERLEFGLSLLHEFGLLEAPKEAEEAPWPPPGGAFLGFLLSRPEPM
 WAELLAGAKEGRVHRAEDPVGALKDLKEIRGLLAKDLSVLALREGREIPPGDDPMLLAYLL
 DPGNTNPEGVARRYGGEWKEDAAARALLSERLWQALYPRVAEEERLLWLYREVERPLAQVLAH
 MEATGVRLDV
 PYLEALSQEVAFELERLEAEVHRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELGLPPIGKT
 EKTGKRSTSAAVLELLREAHPIVGRILEYRELMKLNKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFNQ
 TATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRKAFIAEEGHLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRV
 FREGKDIHTETA
 AWMFGVPPEGVDGAMRRAAKTVNFGVLYGMSAHRLSQELSIPYEEAAA
 FIER5 YFQSF
 PKVRAWIAKTLEEGRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS
 VREAAERMAFNMPVQGTAA
 DLMKMLAMVKLFPRLRPLGVRI LLQVHDELVLLEAPKARAE
 EAAQLAKETMEGVYPLSVPLEVEV
 GMGEDWLSAKE

SEC ID nº 4 ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

MAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVVVV
 VVFDKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVLRLEVPGFEADDVLA
 TLAKRAEKEGYEVRIILTADRDLYQLLSERIAILHPEGYLITPAWLYEKYGLRPEQWVDYRALAGDPS
 DNIPGVKIGIGEKT
 AQRLIREWGSLENLFQHLDQVKPSLREKLQAGMEALALSRKLSQVHTDLP
 LEVD
 FGRRRTPNLEGLRAFLEFGLSLLHEFGLLEGPKAAEEAPWPPPEGAF
 LGFSFSRPEPMWAELLAGAWEGRLHRAQDPLRGLRDLKGV
 RGI LAKDLAVLALREGLDLFPEDDPMLLAYLLDPSNTT
 PEGVARRYGGEWTE
 DAGERALLAERLFQTLKERLKGEERLLWLYEEVEKPLSRVLA
 RMEATGVRLDVAYLQALSLEVEAEVRQLEEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELGLPAIGK
 TEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVDRI LQYRELTKLN
 TYIDPLPALVHPKTGRLHTRFNQTA
 TATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFVAEEGWV
 LVLDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVFOEGRDIHTQTAS
 WMFGVSP
 EGVDP
 LMRRAAKTINFGVLYGMSAHRLSGELSIPYEEAVAFIE
 RYFQSYPKVRAWIEGTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS
 VREAAERMAFNMPVQGTAA
 ADLMKMLAMVRLFPRLQELGARMLLQVHDELVLLEAPK
 DRAERVAALAKEVMEGVWPLQVPLEVE
 10 VGLGEDWLSAKE

SEC ID nº 5 ADN polimerasa de *Thermus sp.* Sps17 (Sps17)

MLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGEVAIVVF
 DAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLEVPGFADDVLA TLAKKA
 EREGYEVRI LSADRDL YQLLSDR IHLHPEGEVLT PGWLQERYGLSPERWVEYRALVGDPSDN
 LPGVPGIGEK TALKLLKEWGSLEA I LKNLDQVKPERVREAI RNNLDKLQMSLELSRLRTDLPL
 EVDFAKRREP DWEG LKAFLERLEFGSLLHEFG LLEAPKEAEEAPWPPP GGAF LGFLLSRPEPM
 WAELLALAGAKEGRVHRAEDPVGALKDLKEIRGLLAKDLSVLALREGREIPPGDDPMLLAYLL
 DPGNTNPEGVARRYGGEWKEDAAARALLSERLWQALYPRVAEEERLLWLYREVERPLAQVLAH
 MEATGVRLDVPYLEALSQEVAFELERLEAEVHRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPPIGKT
 EKTGKRSTSAAVLELLREAHPIVGRILEYRELMKPKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFNQTAT
 ATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRKAFIAEEGHLLVALDYSQIELRVLAHLSGDENLIRVF
 REGKDIHTETAAMFVGVPPEGVDGAMRRAAKTVNFGVLYGMSAHRLSQELSIPYEEAAAFIER
 YFQSFPKVRAWIAKTLEEGRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGTAA
 DLMK LAMVKLFPRLRPLGVRILLQVHDELVLEAPKARAEAAQLAKETMEGVYPLSVPLEVEV
 GMGEDWLSAKA

SEC ID nº 6 ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

MEAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVFDAPKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGYEADDVLA TL
 AKKAEKEGYEVRI LTADRDL YQLVSDRVAVLHPEGH LITPEWLWEKYGLRPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGEK TALKLLKEWGSLENLLKNLDRVKPENVREKI KAHLEDLRLSLELSRVRT
 DLPLEVDLAQGREPDREGLRAFLE RLEFGSLLHEFG LLEAPAPLEEAPWPPP PEGAFVGFVLSR
 PEPMWAE LKALAACRDGRVHRAADPLAGL KDLKEVRGLLAKDLAVLASREGLDLVPGDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTE DAAHRALLSERLHRNLLKRLEGE EKLLWLYHEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRRDVAYLQALSLELAE EIRRLEEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPSLVHPRTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFVGVPPEAVDPLMRRAAKTVNFGVLYGMSAHRLSQELAI PYEEAVA
 5 FIER YFQSFPKVRAWIEKTLEEGRKRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQ
 GTAADLMK LAMVKLFPRLREMGARMLLQVHDELLLEAPQARAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGMGEDWLSAKG

SEC ID nº 7 ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

MEAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVFDAPKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGYEADDVLA TL
 AKNPEKEGYEVRI LTADRDL DQLVSDRVAVLHPEGH LITPEWLWQKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGEK TALKLLKEWGSLENLLKNLDRVKPENVREKI KAHLEDLRLSLELSRVRT
 DLPLEVDLAQGREPDREGLRAFLE RLEFGSLLHEFG LLEAPAPLEEAPWPPP PEGAFVGFVLSR
 PEPMWAE LKALAACRDGRVHRAADPLAGL KDLKEVRGLLAKDLAVLASREGLDLVPGDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTE DAAHRALLSERLHRNLLKRLQGE EKLLWLYHEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRLDVAYLQALSLELAE EIRRLEEEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPSLVHPNTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFVGVPPEAVDPLMRRAAKTVNFGVLYGMSAHRLSQELAI PYEEAVA
 FIER YFQSFPKVRAWIEKTLEEGRKRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQ
 10 GTAADLMK LAMVKLFPRLREMGARMLLQVHDELLLEAPQAGAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGMGEDWLSAKG

SEC ID nº 8

Lys Leu X3 X4 Thr X6 X7 X8 X9 X10 X11, wherein X3 is Lys, Arg
 or Gln; X4 is Asn, Ser or Gly; X6 is any amino acid other than
 Tyr; X7 is Val, Ile or Leu; X8 is Asp or Glu; X9 is Pro, Ala,
 Thr, Ser or Gly; X10 is Leu or Ile; and X11 is Pro or Leu.

SEC ID n° 9

Lys Leu Lys X4 Thr X6 X7 Asp X9 Leu Pro, wherein X4 is Asn or Ser; X6 is any amino acid other than Tyr; X7 is Val or Ile; and X9 is Pro or Ala.

5

SEC ID n° 10

Lys Leu Lys X4 Thr X6 X7 Asp Pro Leu Pro, wherein X4 is Asn or Ser; X6 is any amino acid other than Tyr; and X7 is Val or Ile.

10 SEC ID n° 11

Lys Leu Lys X4 Thr X6 X7 Asp Pro Leu Pro, wherein X4 is Asn or Ser; X6 is Cys or Asn; and X7 is Val or Ile.

SEC ID n° 12 Z05

15

QHRELTCLKNTYVDPLPGLVHPRTGRLHTRFN

SEC ID n° 13 Taq

20

QYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFN

SEC ID n° 14 Tfi

25

EYRELMCLKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFN

SEC ID n° 15 Tfi

QYRELTCLKNTYIDPLPALVHPKTGRLHTRFN

30

SEC ID n° 16 Sps17

EYRELMCLKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFN

SEC ID n° 17 Tth

35

QHRELTCLKNTYVDPLPSLVHPRTGRLHTRFN

SEC ID n° 18 Tca

40

QHRELTCLKNTYVDPLPSLVHPNTGRLHTRFN

SEC ID n° 19 Tma

45

EYRKIQCLKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFN

SEC ID n° 20 Tne

EFRKILCLKSTYIDTLPKLVNPKTGRFHASFH

50

SEC ID n° 21 Taf

EYRKYQCLKSTYIDSIPLSINRKTNRVHTTFH

55

SEC ID n° 23 Dra

EFRELDKLRGTYLDPIPNLVNPHTGRLHTTFA

SEC ID n° 24 Bst

60

HYRQLGKLQSTYIEGLLKVVHPVTGKVHTMFN

SEC ID nº 25 Bca

HYRQLGKQLQSTYIEGLLKVVPRDTPKVVHTIFN

5

SEC ID nº 26 motivo de consenso nativo

Lys Leu X3 X4 Thr Tyr X7 X8 X9 X10 X11, wherein X3 is Lys, Arg or Gln; X4 is Ser, Asn or Gly; X7 is Val, Ile or Leu; X8 is Asp or Glu; X9 is Pro, Ala, Thr, Ser or Gly; X10 is Leu or Ile; and X11 is Pro or Leu.

10 SEC ID nº 27 sitio modificado de Z05 D580

T-G-R-L-S-S-X7-X8-P-N-L-Q-N

wherein X7 is Ser (S) or Thr (T); and X8 is any amino acid other than Asp (D), or Glu (E)

15 SEC ID nº 28 Sitio activo conservado de ADN polimerasa

DYSQIELR

SEC ID nº 29 ADN polimerasa CS5

20 MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFASLLKALKEDGYKAV
 FVVFDAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
 AKKAEREGYEVRIILTADRDLVQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGIKTALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
 DLPLEVDFARRREPDREGLRAFLEFGLSLLHEFGLLEESEPVGYRIVKDLVEFEKLIIEKLR
 ESPSFAIDLETSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDEKEVLKKLKEILEDPG
 AKIVGQNLKFDYKVLVKGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
 MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRKYKTLTKLHEADLENVYKIEMLVNVLA
 RMELNGVYVDTEFLKLLSEEYGKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRKG
 TTKTGDIYSTRIEVLEELAGEHEIIPLILEYRKIQKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIQVQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDENLLR
 AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
 VNYFVLYPKVRDYIQRVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIPQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
 AADI IKLAMIEIDRELKERKMRSKMI IQVHDELVFEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKLSVPL
 EVDVTIGKTWS

SEC ID nº30 ADN polimerasa CS6

25 MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFASLLKALKEDGYKAV
 FVVFDAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
 AKKAEREGYEVRIILTADRDLVQLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKIGIKTALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
 DLPLEVDFARRREPDREGLRAFLEFGLSLLHEFGLLEESEPVGYRIVKDLVEFEKLIIEKLR
 ESPSFAIALATSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDEKEVLKKLKEILEDPG
 AKIVGQNLKFDYKVLVKGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
 MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRKYKTLTKLHEADLENVYKIEMLVNVLA
 RMELNGVYVDTEFLKLLSEEYGKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRKG
 TTKTGDIYSTRIEVLEELAGEHEIIPLILEYRKIQKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIQVQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDENLLR
 AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
 VNYFVLYPKVRDYIQRVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIPQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
 AADI IKLAMIEIDRELKERKMRSKMI IQVHDELVFEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKLSVPL
 EVDVTIGKTWS

SEC ID nº 31 Cebador directo

5'-CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3'

5

SEC ID nº 32 Cebador inverso

5'-ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTA-3'

10 SEC ID nº 33 Dominio de polimerasa de la ADN polimerasa Z05 D580G

CTACCTCCTGGACCCCTCCAAACACCACCCCGAGGGGGTGGCCCGGCGCTACGGGGGGGAGTG
GACGGAGGACGCCGCCACCGGGCCCTCCTCGCTGAGCGGCTCCAGCAAACCTCTTGGAACG
CCTCAAGGGAGAGGAAAAGCTCCTTTGGCTCTACCAAGAGGTGGAAAAGCCCCTCTCCCGGT
CCTGGCCACATGGAGGCCACCGGGGTAAGGCTGGACGTGGCCTATCTAAAGGCCCTTTCCCT
GGAGCTTGCGGAGGAGATTCGCCGCTCGAGGAGGAGGTCTTCCGCTGGCGGGCCACCCCTT
CAACCTGAACTCCCGTGACCAGCTAGAGCGGGTGCTCTTTGACGAGCTTAGGCTTCCCGCCCT
GGGCAAGACGCAAAGACGGGGAAGCGCTCCACCAGCGCCGCGGTGCTGGAGGCCCTCAGGGA
GGCCACCCCATCGTGGAGAAGATCCTCCAGCACCGGGAGCTCACAAGCTCAAGAACACCTA
CGTAGACCCCTCCCGGGCCTCGTCCACCCGAGGACGGGCCGCTCCACACCCGCTTCAACCA
GACAGCCACGGCCACGGGAAGGCTCTCTAGCTCCGGGCCAACCTGCAGAACATCCCATCCG
CACCCCTTGGGCCAGAGGATCCGCCGGGCTTTCGTGGCCGAGGCGGGATGGGCGTTGGTGGC
CCTGGACTATAGCCAGATAGAGCTCCGGGTCTCGCCACCTCTCCGGGGACGAGAACCTGAT
CAGGGTCTTCCAGGAGGGGAAGGACATCCACACCCAGACCGCAAGCTGGATGTTCCGGCGTCTC
CCCGGAGGCCGTGGACCCCTGATGCGCCGGGCGGCCAAGACGGTGAACCTTCGGCGTCTCTA
CGGCATGTCCGCCCATAGGCTCTCCAGGAGCTTGCCATCCCCTACGAGGAGGCGGTGGCCTT
TATAGAGCGCTACTTCCAAAGCTTCCCCAAGGTGCGGGCCTGGATAGAAAAGACCCTGGAGGA
GGGGAGGAAGCGGGGCTACGTGGAAACCTCTTTCGGAAGAAGGCGCTACGTGCCCGACCTCAA
CGCCCGGGTGAAGAGCGTCAGGGAGGCCGCGGAGCGCATGGCCTTCAACATGCCCGTCCAGGG
CACCGCCGCCGACCTCATGAAGCTCGCCATGGTGAAGCTCTTCCCCACCTCCGGGAGATGGG
GGCCCGCATGCTCCTCCAGGTCCACGACGAGCTCCTCCTGGAGGCCCCCAAGCGCGGGCCGA
GGAGGTGGCGGCTTTGGCCAAGGAGGCCATGGAGAAGGCTATCCCCTCGCCGTGCCCTGGA
GGTGGAGGTGGGGATCGGGGAGGACTGGCTTTCGCCAAGGGCTGATATCAGATCTCCCTGAT
TATGCGTCAGTCTATGAAGAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAGAATCCTTGTGAATTT
AACAGAGGGTATAGGGATTACACGCCACTACCAGTTGGTTAT

15 SEC ID nº 34 - secuencia de tipo salvaje de BRAF

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTT
TGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA

20 SEC ID nº 35 - secuencia mutante de BRAF V600R

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAGGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTT
TGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA

SEC ID nº 36 ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)

MADASPDPSKPDALVLDGHALAFRSYFALPPLNNSKGMTDAIVGFMKLLLRRLARQKSNQVI
 VVFDPPVKTLRHEQYEGYKSGRAQTPEDLRGQINRIRALVDALGFPRLEEPGYEADDVIASLT
 RMAEGKGYEVRIVTSRDAYQLLDEHVKVIANDFSLIGPAQVEEKYGVTVRQWVDYRALTGDA
 SDNIPGAKGIGPKTAAKLLQEYGTLEKVEAAHAGTLKPDGTRKLLDSEENVKFSHDLSCMV
 TDLPLDIEFGVRRLPDNPLVTEDLLTELELHSLRPMILGLNGPEQDGHAPDDLLEREHAQTPE
 EDEAAALPAFSAPELAEWQTPAEGAVWGYVLSREDDLTAAALLAAATFEDGVARPARVSEPDEW
 AQAEAPENLFGELLPSDKPLTKKEQKALEKAQKDAEKARAKLREQFPATVDEAEFVGQRTVTA
 AAKALAAHLSVRGTVVEPGDDPLLYAYLLDPANTNMPVAVAKRYLDREWPADAPTRAAITGHL
 VRELPLLDARRKMYDEMEKPLSGVLGRMEVVRGVQVDSDFLQTLISIQAGVRLADLESQIHEY
 AGEEFHIRSPKQLETVLYDKLELASSKKTCLTGQRSTAVSALEPLRDAHPIIPLVLEFRELDK
 LRGTYLDPIPNLVNPHGTGRLLHTTFAQTAVATGRLSSLNPNLQNIPIRSELGREIRKGFIAEDG
 FTLIAADYSQIELRLLAHIADDPLMQQAFVEGADIHRRATAQVLGLDEATVDANORRAAKTVN
 FGVLYGMSAHRLSNDLGIPIYAEAATFIEIYFATYPGIRRYINHTLDFGRTHGYVETLYGRRRY
 VPGLSSRNVRVQREAEERLAYNMPIQGTAAIMKLAMVQLDPQLDAIGARMLLQVHDELLIEAP
 LDKAEQVAALTKKVMENVVQLKVPLAVEVGTGPNWFDTK

SEC ID nº 37 ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

MGKMFLFDGTGLVYRAFYAIDQSLQTSGLHTNAVYGLTKMLIKFLKEHISIGKDACVFLDS
 KGGSKKRKDILETYKANRPSTPDLLLEQIPYVEELVDALGIKVLKIEGFEADDIIATLSKKFE
 SDFEKNIIITGDKDLLQLVSDKVFVWRVERGITDLVLYDRNKVIEKYGIYPEQFKDYLSLVGD
 QIDNIPGVKIGKKTAVSLLKKYNSLENVLKNINLLETKLRRLLLEDSKEDLQKSIELVELIYD
 VPMDVEKDEIIRGYNPKLLKVLKKYEFSSIIKELNLQEKLEKEYILVDNEDKLLKLAEEIE
 KYKTFSIDTETSLDPFEAKLVGISISTMEGKAYYIPVSHFGAKNISKSLIDKFLKQILQEKD
 YNIVGQNLKFDYEIFKSMGFSPNPHFDTMIAAYLLNPDEKRFNLEELSLKYLGYKMSFDEL
 VNENVPLFGNDFSYPLERAVEYSCEDADVITYRIFRKLGRKIYENEMEKLFEIEMPLIDVLS

EMELNGVYFDEEYKELSKKYQEKMDGIEKVFIEIAGETFNLSSTQVAYILFEKLNIAPIYKK
 TATGKFSTNAEVLLELSKEHEIAKLLLEYRKYQKSTYIDSIPLSINRKTNRVHTTFHQGT
 STGRLSSSNPNLQNLPTRESEGKEIRKAVRPQRQDWWILGADYSQIELRVLAVHSKDENLLKA
 FKEDLDIHTITAAKIFGVSEMFVSEQMRRVGMVNFIIYGVSPYGLSKRIGLSVSETKKIID
 NYFRYYKGVFEYLKRMKDEARKKGYVTTLFGRRRYIPQLRSKNGNRVQEGERIAVNTPIQGT
 ADIIKIAMINIHNRLLKKNLRSKMILQVHDELVFEVDPNELEIVKDLVRDEMENAOKLDVPLK
 5 VDVYYGKEWE

SEC ID nº 38 ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)

MARLFLFDGTALAYRAYYALDRSLSTSTGIPNTATYGVARMLVRFIKDHIIVGKDYVAVAFDK
 KAATFRHKLLETYKAQRPKTPDLLIQQLPYIKKLVEALGMKVLEVEGYEADDIIATLAVKGLP
 LFDEIFIVTGDKDMLQLVNEKIKVWRIVKGISDLELYDAQVKEKYGVEPQQIPDLLALTGDE
 IDNIPGVTGIGEKTAVQLEKYKDLEDILNHVRELTPQKVRKALLRDRENAIILSKKLAILETNV
 PIEINWHEELRYQGYDREKLLPLLKELEFASIMKELQLYEESSEPVGYRIVKDLVEFEKLEKLR
 ESPSFAIDLETSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDEKEVLKLLKEILEDPG
 AKIVGQNLKFDYKVLVKGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
 MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRLYKTLSSLKLEADLENVYKIEMLVNVLA
 RMELNGVYVDTEFLKLLSEEYGGKLEELAEIYRIAGEPFNINSKQVSRILFEKLGIKPRGK
 TTKTGDYSTRIEVLEELAGEHEIIPLILEYRKIQKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIVPQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDENLLR
 AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
 VNYFVLYPKVRDYIQRVSEAKEKGYVRTLFGGRKRDIPQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
 AADIIKLAMIEIDRELKERKMRSKMIQVHDELVFEVPEEKDALVELVKDRMTNVVKLSPVPL
 10 EVDVTIGKTS

SEC ID nº 39 *Thermotoga neopolitana* DNA polymerase (Tne)

MARLFLFDGTALAYRAYYALDRSLSTSTGIPITNAVYGVARMLVKFIKEHI IPEKDYAAVAFDK
 KAATFRHKLLVSDKAQRPKTPALLVQQLPYIKRLIEALGFKVLELEGEYADDI IATLAVRAAR
 FLMRFLSLITGDKDMLQLVNEKIKVWRIVKGISDLELYDSKKVKERYGVEPHQIPDLLALTGDD
 IDNIPGVTGIGEKTAVQLLGKYRNLEYILEHARELPQRVRKALLRDREVAIILSKKLATLVTNA
 PVEVDWEEMKYRGYDKRKLPLILKELEFASIMKELQLYEEAEPTGYEIVKDHKTFEDLIEKLEK
 EVPSFALDLETSSLDPFNCEIVGIVSVSFKPKTAYYIPLHHRNAHNLDLTVLSKLEILEDPS
 SKIVGQNLKYDYKVLVVGKISPVYPHFDTMIAAYLLEPNEKKFNLEDLSLKFLGYKMTSYQEL
 MSFSSPLFGFSFADVPVDKAAEYSCEDADITYRLYKILSMKLHEAELENVYRIEMPLVNVLA
 RMEFNWVYVDTEFLKLLSEEYGGKLEELAELKIQIAGEPFNINSKQVSNILFEKLGKIKPRGK
 TTKTGDYSTRIEVLEEIANEHEIVPLILEFRKILKLEKSTYIDTLPKLVNPKTGRFHASFHQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIIVPQDPDWIIVSADYSQIELRI LAHLSGDNELVK
 AFEEGIDVHTLTASRIYNVKPEEVNEEMRRVVGKMNFSI IYGVTPYGLSVRLGIPVKEAEKMI
 ISYFTLYPKVRSYIQQVVAEAKEKGYVRTLFGKRDI PQLMARDKNTQSEGERIAINTPIQGT
 AADI I K L A M I D I D E E L R K R N M K S R M I I Q V H D E L V F E V P D E E K E E L V D L V K N K M T N V V K L S V P L
 E V D I S I G K S W S

5 SEC ID nº 40 ADN polimerasas de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)

MKNKLVLDIGNSVAYRAFFALPLLHNDKGIHTNAVYGFTMMLNKILAEEQPTHLVAFDAGKT
 TFRHETFQDYKGGQQTPPELSEQFPLLRELLKAYRI PAYELDHYEADDI IGTMAARAEREGF
 AVKVISGDRDLTQLASPVQVTVEITKKGITDIESYTPETVVEKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDN
 I PGVPGIGEKTAVKLLKQFGTVENVLASIDEIKGEKLEKLRQYRDLALLSKQLAAICRDAPV
 ELTLDDIVYKGEDREKVVALFQELGFQSFLEKMAVQTDGEKPLAGMDFAIADSVTDEMLADK

AALVVEVVDNYHHAPIVGI ALANERGRFFLRPETALADPKFLAWLGDET KKKTMFDSKRAAV
 ALKWKGI ELRGVVF D L L L A A Y L L D P A Q A A G D V A A V A K M H Q Y E A V R S D E A V Y G K G A K R T V P D E P
 T L A E H L A R K A A A I W A L E E P L M D E L R R N E Q D R L L T E L E Q P L A G I L A N M E F T G V K V D T K R L E Q M G
 A E L T E Q L Q A V E R R I Y E L A G Q E F N I N S P K Q L G T V L F D K L Q L P V L K K T K T G Y S T S A D V L E K L A P H
 H E I V E H I L H Y R Q L G K L Q S T Y I E G L L K V V H P V T G K V H T M F N Q A L T Q T G R L S S V E P N L Q N I P I R L
 E E G R K I R Q A F V P S E P D W L I F A A D Y S Q I E L R V L A H I A E D D N L I E A F R R G L D I H T K T A M D I F H V S
 E E D V T A N M R R Q A K A V N F G I V Y G I S D Y G L A Q N L N I T R K E A A E F I E R Y F A S F P G V K Q Y M D N I V Q E
 A K Q K G Y V T T L L H R R R Y L P D I T S R N F N V R S F A E R T A M N T P I Q G S A A D I I K K A M I D L S V R L R E E R
 L Q A R L L L Q V H D E L I L E A P K E E I E R L C R L V P E V M E Q A V A L R V P L K V D Y H Y G P T W Y D A K

10 SEC ID nº 41 ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)

MKKKLVLDIGSSVAYRAFFALPLLHNDKGIHTNAVYGFTMMLNKILAE EEP THMLVAFDAGKT
 TFRHEAFQEYKGGQQTPPELSEQFPLLRELLRAYRI PAYELENYEADDI IGTLAARAEQEGF
 EVKVISGDRDLTQLASPHVTVDITKKGITDIEPYTPPEAVREKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDN
 I PGVPGIGEKTAVKLLRQFGTVENVLASIDEIKGEKLEKLRQHREMA L L S K K L A A I R R D A P V
 E L S L D D I A Y Q G E D R E K V V A L F K E L G F Q S F L E K M E S P S S E E E K P L A K M A F T L A D R V T E E M L A D K
 A A L V V E V V E E N Y H D A P I V G I A V V N E H G R F F L R P E T A L A D P Q F V A W L G D E T K K K S M F D S K R A A V
 A L K W K G I E L C G V S F D L L L A A Y L L D P A Q G V D D V A A A A K M K Q Y E A V R P D E A V Y G K G A K R A V P D E P
 V L A E H L V R K A A A I W A L E R P F L D E L R R N E Q D R L L V E L E Q P L S S I L A E M E F A G V K V D T K R L E Q M G
 E E L A E Q L R T V E Q R I Y E L A G Q E F N I N S P K Q L G V I L F E K L Q L P V L K K S K T G Y S T S A D V L E K L A P Y
 H E I V E N I L Q H Y R Q L G K L Q S T Y I E G L L K V V R P D T K K V H T I F N Q A L T Q T G R L S S T E P N L Q N I P I R
 L E E G R K I R Q A F V P S E S D W L I F A A D Y S Q I E L R V L A H I A E D D N L M E A F R R D L D I H T K T A M D I F Q V
 S E D E V T P N M R R Q A K A V N F G I V Y G I S D Y G L A Q N L N I S R K E A A E F I E R Y F E S F P G V K R Y M E N I V Q
 E A K Q K G Y V T T L L H R R R Y L P D I T S R N F N V R S F A E R M A M N T P I Q G S A A D I I K K A M I D L N A R L K E E
 R L Q A R L L L Q V H D E L I L E A P K E E M E R L C R L V P E V M E Q A V T L R V P L K V D Y H Y G S T W Y D A K

SEC ID nº 42

Lys Leu X3 X4 Thr X6 X7 X8 X9 X10a X11, wherein X3 is Lys, Arg or Gln; X4 is Asn, Ser or Gly; X6 is Gly, Ala, Leu, Met, Trp, Pro, Ser, Thr, Phe, Cys, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Val, Ile or His; X7 is Val, Ile or Leu; X8 is Asp or Glu; X9 is Pro, Ala, Thr, Ser or Gly; X10 is Leu or Ile; and X11 is Pro or Leu.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
<110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH
<120> ADN polimerasas con discriminación incrementada de no correspondencias 3'
- 10
<130> 26746 WO-HS
<140> Todavía no asignado
<141> Todavía no asignado
- 15
<150> US 61/356,280
<151> 2010-06-18
<160> 42
- 20
<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 834
<212> PRT
- 25
<213> *Thermus* sp.
<220>
<223> ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05)
- 30
<400> 1

ES 2 536 978 T3

Met	Lys	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	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	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 Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 Ala Lys Asp Pro 340 Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp
 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln
 Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560
 Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu
 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly
 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu
 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val
 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 Lys Gly 820

<210> 2
 5 <211> 832
 <212> PRT
 <213> Thermus aquaticus

<220>
 10 <223> ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

<400> 2

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50 Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65 Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 85 Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Glu Gly
 290 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

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

5

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

<400> 3

10

```

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
    
```

Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Arg Lys Ala Glu Arg
 100 115 120 125
 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 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			

<21

0> 4

<211> 831

<212> PRT

5 <213> *Thermus flavus*

<220>

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

10 <400> 4

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

Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu
 275 280 285
 Gly Pro Lys Ala Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu 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 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 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

<210> 5

<211> 830

5 <212> PRT

<213> *Thermus* sp.

<220>

10 <223> ADN pol. sps17 de *Thermus* sp.

<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	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	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

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	Ala		
			820					825					830		

<210> 6
 <211> 834
 5 <212> PRT
 <213> *Thermus thermophilus*

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

10 <400> 6

ES 2 536 978 T3

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 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 90 Glu Asp Phe Pro Arg 95 Gln
 Leu Ala Leu Ile 100 Lys Glu Leu Val Asp 105 Leu Leu Gly Phe Thr Arg 110 Leu
 Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys 125
 Lys Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg 140
 Asp 145 Leu Tyr Gln Leu Val 150 Ser Asp Arg Val Ala 155 Val Leu His Pro Glu 160
 Gly His Leu Ile Thr 165 Pro Glu Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg 175
 Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala 185 Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp 190
 Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu 205
 Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg 220
 Val 225 Lys Pro Glu Asn Val 230 Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp 240
 Leu Arg Leu Ser Leu 245 Glu Leu Ser Arg Val 250 Arg Thr Asp Leu Pro Leu 255
 Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu 265 Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg 270
 Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly 285
 Leu Leu Glu Ala Pro Ala 295 Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro 300
 Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp 320
 Ala Glu Leu Lys Ala 325 Leu Ala Ala Cys Arg 330 Asp Gly Arg Val His Arg 335
 Ala Ala Asp Pro 340 Leu Ala Gly Leu Lys 345 Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp 365
 Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro 375 Met Leu Leu Ala Tyr 380 Leu Leu Asp Pro 385
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp 400
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg 415
 Asn Leu Leu Lys Arg Leu Glu Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr 430
 His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala 445
 Thr Gly Val Arg Arg Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu 460
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala 480
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu 495
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly 510
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His 525
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys 540
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Arg Thr Gly 560
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu 575
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu 590
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu 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					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
 5 <212> PRT
 <213> *Thermus caldophilus*

<220>
 10 <223> ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)
 <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 Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
 115 120 125
 Asn Pro Glu Lys Glu 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

- <210> 8
- <211> 11
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

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

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (3)...(3)
- <223> Xaa = Lys, Arg o Gln
- 15

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (4)...(4)
- <223> Xaa = Asn, Ser o Gly
- 20

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (6)...(6)
- <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Tyr
- 25

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

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)...(8)
- <223> Xaa = Asp o Glu
- 35

- <220>

<221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Pro, Ala, Thr, Ser o Gly

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Leu o Ile

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Pro o Leu

15 <400> 8

Lys Leu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

20 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asn o Ser

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Tyr

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Val o Ile

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Pro o Ala

<400> 9

Lys Leu Lys Xaa Thr Xaa Xaa Asp Xaa Leu Pro
1 5 10

50 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asn o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Tyr
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Val o Ile
 10
 <400> 10

Lys Leu Lys Xaa Thr Xaa Xaa Asp Pro Leu Pro
1 5 10

 15 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> motivo sintético de dominio de ADN polimerasa

 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asn o Ser

 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = cys o Asn

 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Val o Ile

 <400> 11

Lys Leu Lys Xaa Thr Xaa Xaa Asp Pro Leu Pro
1 5 10

 40 <210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05)
 50 <400> 12

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

 55 <210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 536 978 T3

<220>

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

<400> 13

5

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

<210> 14

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

15

<400> 14

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

20

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

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

<400> 15

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

30

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

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

40

<400> 16

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

45

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

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

<400> 17

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

5 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)
 <400> 18

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

15 <210> 19
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma)
 <400> 19

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

25 <210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)
 <400> 20

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

40 <210> 21
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)
 <400> 21

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

50

<210> 22

<400> 22
000

5

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

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

15

<400> 23

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

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

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

25

<400> 24

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

30

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)

40

<400> 25

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

45

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo de consenso nativo sintético para la región del dominio de polimerasa de ADN polimerasa bacteriana

50

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = Lys, Arg o Gln

55

<220>
<221> VARIANTE

- <222> (4)...(4)
<223> Xaa = Ser, Asn or Gly
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Val, Ile o Leu
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Asp o Glu
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = Pro, Ala, Thr, Ser o Gly
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Leu o Ile
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)...(11)
<223> Xaa = Pro o Leu
- 30 <400> 26
Lys Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10
- 35 <210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> motivo de polimerasa sintética correspondiente a la mutación D580X de z05, motivo de Z05 D580 modificado
- 40 <220>
<221> VARIANTE

<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Ser o Thr
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Asp o Glu
- 50 <400> 27
Thr Gly Arg Leu Ser Ser Xaa Xaa Pro Asn Leu Gln Asn
1 5 10
- 55 <210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> motivo A conservado de sitio activo de ADN polimerasa sintética

<400> 28

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg
1 5

5 <210> 29
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ADN polimerasa CS5 química sintética derivada de dominio de nucleasa 5' N-terminal de Z05 de *Thermus* sp. y dominios de exonucleasa 3'-5' C-terminal y de polimerasa de las ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*

15 <400> 29

Met Lys 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
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Leu
Glu	Val	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys
Lys	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg
Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
Gly	His	Leu	Ile	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Lys
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg
Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu
Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	Asp	Leu
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe
Ala	Ile	Asp	Leu	Glu	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
 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 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>
 10 <223> ADN polimerasa CS6 quimérica sintética derivada del dominio de nucleasa 5' N-terminal de Z05 de *Thermus*
 sp. y exonucleasas 3'-5' C-terminal y dominios de 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 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
 Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
 195 200
 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
 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 Glu 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
 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
 420 425 430 440
 Tyr Lys Met Thr Ser Tyr Gln Glu Leu Met Ser Phe Ser Phe Pro Leu
 435 440 445 450
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Glu Lys Ala Ala Asn Tyr
 455 460 465
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Ser
 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
 515 520 525 530
 Leu Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Tyr Arg Ile Ala Gly Glu Pro Phe
 535 540 545
 Asn Ile Asn Ser Pro Lys Gln Val Ser Arg Ile Leu Phe Glu Lys Leu
 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 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> 31
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador directo de amplificación por PCR sintética con tendencia a errores (mutagénica)

<400> 31
 ctacctctg gaccctcca a

<210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador inverso de amplificación por PCR sintética con tendencia a errores (mutagénica)

<400> 32
 ataaccaact ggtagtggcg tgtaa 25

<210> 33
 <211> 1491
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> amplicón sintético codificante de dominio polimerasa de ADN polimerasa Z05 D580G amplificado mediante PCR con tendencia a errores (mutagénica) entre los sitios de restricción BlnI y BglII

<400> 33

ctacctctg gaccctcca acaccacccc cgagggggtg gcccggcgct acggggggga 60
gtggacggag gacgccgcc accgggccct cctcgctgag cggctccagc aaaacctctt 120
ggaacgcctc aagggagagg aaaagctcct ttggctctac caagaggtgg aaaagcccct 180
ctccccgggtc ctggcccaca tggaggccac cggggtaagg ctggacgtgg cctatctaaa 240
ggccctttcc ctggagcttg cggaggagat tgcgccctc gaggaggagg tcttccgcct 300
ggcgggccac cccttcaacc tgaactcccg tgaccagcta gagcgggtgc tctttgacga 360
gcttaggctt cccgccctgg gcaagacgca aaagacgggg aagcgctcca ccagcggccg 420

```

ggtgctggag gccctcaggg aggccacc ccacgtggag aagatcctcc agcaccggga 480
gctcaccaag ctcaagaaca cctacgtaga cccctccc ggccctcgtcc acccgaggac 540
gggccgcctc cacaccgct tcaaccagac agccacggcc acgggaaggc tctctagctc 600
cgggcccaac ctgcagaaca tccccatccg caccctctg ggccagagga tccgccgggc 660
cttcgtggcc gaggcgggat gggcgttggt ggccctggac tatagccaga tagagctccg 720
ggtcctcgcc cacctctccg gggacgagaa cctgatcagg gtcttccagg aggggaagga 780
catccacacc cagaccgcaa gctggatggt cggcgtctcc ccggaggccg tggacccccct 840
gatgcgccgg gcggccaaga cggtgaactt cggcgtctcc tacggcatgt ccgcccatag 900
gctctcccag gagcttgcca tcccctacga ggaggcggtg gcctttatag agcgctactt 960
ccaaagcttc cccaagggtc gggcctggat agaaaagacc ctggaggagg ggaggaagcg 1020
gggctacgtg gaaaccctct tcggaagaag gcgctacgtg cccgacctca acgcccgggt 1080
gaagagcgtc agggaggccg cggagcgcac ggccttcaac atgcccgctc agggcaccgc 1140
cgccgacctc atgaagctcg ccatggtgaa gctcttccc cacctccggg agatgggggc 1200
ccgcatgctc ctccagggtc acgacgagct cctcctggag gcccccgaag cgcgggccga 1260
ggaggtggcg gctttggcca aggaggccat ggagaaggcc tatcccctcg ccgtgccccct 1320
ggaggtggag gtggggatcg gggaggactg gctttccgcc aagggtgat atcagatctc 1380
cctgattatg cgtcagtcta tgaagaaaaa tcgtatacag atggacgaag agagaatcct 1440
tgtgaattta acagagggta tagggattac acgccactac cagttgggta t 1491

```

5 <210> 34
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> polinucleótido diana de tipo salvaje sintético BRAF V600R

<400> 34

```

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

```

15 <210> 35
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> polinucleótido diana mutante sintético BRAF V600R

<400> 35

```

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

```

30 <210> 36
 <211> 921
 <212> PRT
 <213> Deinococcus radiodurans

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

35 <400> 36

ES 2 536 978 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

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
		275					280					285			
Ile	Leu	Gly	Leu	Asn	Gly	Pro	Glu	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Pro	Asp	Asp
	290					295					300				
Leu	Leu	Glu	Arg	Glu	His	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala
305					310					315					320
Ala	Leu	Pro	Ala	Phe	Ser	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Glu	Trp	Gln	Thr	Pro
				325				330						335	
Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Trp	Gly	Tyr	Val	Leu	Ser	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu
			340					345					350		
Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Gly	Val	Ala	Arg
		355					360					365			
Pro	Ala	Arg	Val	Ser	Glu	Pro	Asp	Glu	Trp	Ala	Gln	Ala	Glu	Ala	Pro
	370					375					380				
Glu	Asn	Leu	Phe	Gly	Glu	Leu	Leu	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Leu	Thr	Lys
385					390					395					400
Lys	Glu	Gln	Lys	Ala	Leu	Glu	Lys	Ala	Gln	Lys	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala
				405					410					415	
Arg	Ala	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Phe	Pro	Ala	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Glu
			420					425					430		
Phe	Val	Gly	Gln	Arg	Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala
		435					440					445			
Ala	His	Leu	Ser	Val	Arg	Gly	Thr	Val	Val	Glu	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro
	450					455					460				
Leu	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Ala	Asn	Thr	Asn	Met	Pro	Val
465					470					475					480
Val	Ala	Lys	Arg	Tyr	Leu	Asp	Arg	Glu	Trp	Pro	Ala	Asp	Ala	Pro	Thr
				485				490						495	
Arg	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	His	Leu	Val	Arg	Glu	Leu	Pro	Pro	Leu	Leu
			500					505					510		
Asp	Asp	Ala	Arg	Arg	Lys	Met	Tyr	Asp	Glu	Met	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser
		515					520					525			
Gly	Val	Leu	Gly	Arg	Met	Glu	Val	Arg	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Ser	Asp
	530					535					540				
Phe	Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Gln	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Asp	Leu
545					550					555					560
Glu	Ser	Gln	Ile	His	Glu	Tyr	Ala	Gly	Glu	Glu	Phe	His	Ile	Arg	Ser
				565				570						575	
Pro	Lys	Gln	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Tyr	Asp	Lys	Leu	Glu	Leu	Ala	Ser
			580					585					590		
Ser	Lys	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Ala
		595					600					605			
Leu	Glu	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	His	Pro	Ile	Ile	Pro	Leu	Val	Leu	Glu
	610					615					620				
Phe	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	Gly	Thr	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ile	Pro
625					630					635					640
Asn	Leu	Val	Asn	Pro	His	Thr	Gly	Arg	Leu	His	Thr	Thr	Phe	Ala	Gln
				645				650						655	
Thr	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	Asn	Leu	Gln

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

5 <212> PRT

<213> Thermosipho africanus

<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
 355 360 365
 Phe Leu Lys Gln Ile Leu Gln Glu Lys Asp Tyr Asn Ile Val Gly Gln
 370 375 380
 Asn Leu Lys Phe Asp Tyr Glu Ile Phe Lys Ser Met Gly Phe Ser Pro
 385 390 395 400
 Asn Val Pro His Phe Asp Thr Met Ile Ala Tyr Leu Leu Asn Pro
 405 410 415
 Asp Glu Lys Arg Phe Asn Leu Glu Glu Leu Ser Leu Lys Tyr Leu Gly
 420 425 430
 Tyr Lys Met Ile Ser Phe Asp Glu Leu Val Asn Glu Asn Val Pro Leu
 435 440 445
 Phe Gly Asn Asp Phe Ser Tyr Val Pro Leu Glu Arg Ala Val Glu Tyr
 450 455 460
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp Val Thr Tyr Arg Ile Phe Arg Lys Leu Gly
 465 470 475 480
 Arg Lys Ile Tyr Glu Asn Glu Met Glu Lys Leu Phe Tyr Glu Ile Glu
 485 490 495
 Met Pro Leu Ile Asp Val Leu Ser Glu Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr
 500 505 510
 Phe Asp Glu Glu Tyr Leu Lys Glu Leu Ser Lys Lys Tyr Gln Glu Lys
 515 520 525
 Met Asp Gly Ile Lys Glu Lys Val Phe Glu Ile Ala Gly Glu Thr Phe
 530 535 540
 Asn Leu Asn Ser Ser Thr Gln Val Ala Tyr Ile Leu Phe Glu Lys Leu
 545 550 555 560
 Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Lys Thr Ala Thr Gly Lys Phe Ser Thr Asn
 565 570 575
 Ala Glu Val Leu Glu Glu Leu Ser Lys Glu His Glu Ile Ala Lys Leu
 580 585 590
 Leu Leu Glu Tyr Arg Lys Tyr Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile Asp
 595 600 605
 Ser Ile Pro Leu Ser Ile Asn Arg Lys Thr Asn Arg Val His Thr Thr
 610 615 620
 Phe His Gln Thr Gly Thr Ser Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asn Pro
 625 630 635 640
 Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Arg Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile Arg
 645 650 655
 Lys Ala Val Arg Pro Gln Arg Gln Asp Trp Trp Ile Leu Gly Ala Asp
 660 665 670
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Val Ser Lys Asp Glu
 675 680 685
 Asn Leu Leu Lys Ala Phe Lys Glu Asp Leu Asp Ile His Thr Ile Thr
 690 695 700
 Ala Ala Lys Ile Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Gln Met
 705 710 715 720
 Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ala Ile Ile Tyr Gly Val Ser
 725 730 735

Pro Tyr Gly Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu Thr Lys
 740 745 750
 Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr
 755 760 765
 Leu Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr
 770 775 780
 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Leu Arg Ser Lys Asn Gly
 785 790 795 800
 Asn Arg Val Gln Glu Gly Glu Arg Ile Ala Val Asn Thr Pro Ile Gln
 805 810 815
 Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ile Ala Met Ile Asn Ile His Asn
 820 825 830
 Arg Leu Lys Lys Glu Asn Leu Arg Ser Lys Met Ile Leu Gln Val His
 835 840 845
 Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Asn Glu Leu Glu Ile Val Lys
 850 855 860
 Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro
 865 870 875 880
 Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu
 885 890

<210> 38
 <211> 893
 5 <212> PRT
 <213> Thermotoga maritima

<220>
 <223> ADN polimerasa de Thermotoga maritima (Tma)

10 <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

ES 2 536 978 T3

	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

His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu
 835 850 855 860 865 870 875 880
 Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
 885 890
 Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser

<210> 39

<211> 893

<212> PRT

5 <213> Thermotoga neopolitana

<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
 Phe Gly Phe Ser Phe Ala Asp Val Pro Val Asp Lys Ala Ala Glu Tyr
 450 455 460
 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
 565 570 575
 Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Ile Ala Asn Glu His Glu Ile Val Pro
 580 585 590
 Leu Ile Leu Glu Phe Arg Lys Ile Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
 595 600 605
 Asp Thr Leu Pro Lys Leu Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Phe His Ala
 610 615 620
 Ser Phe His 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 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 Val Lys Ala Phe Glu Glu Gly Ile Asp Val His Thr Leu
 690 695 700
 Thr Ala Ser Arg Ile Tyr Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Asn Glu Glu
 705 710 715 720
 Met Arg Arg Val 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 Ile Pro Val Lys Glu Ala
 740 745 750
 Glu Lys Met Ile Ile Ser Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Lys Val Arg Ser
 755 760 765
 Tyr Ile Gln Gln Val Val Ala 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
 Lys Asn Thr Gln Ser 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 Asp Ile Asp
 820 825 830
 Glu Glu Leu Arg Lys Arg Asn Met Lys Ser Arg Met Ile Ile Gln Val
 835 840 845
 His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Glu Glu Lys Glu Glu Leu
 850 855 860
 Val Asp Leu Val Lys Asn Lys Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
 865 870 875 880
 Pro Leu Glu Val Asp Ile Ser Ile Gly Lys Ser Trp Ser
 885 890

<210> 40

<211> 876

5 <212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilus

<220>

10 <223> ADN polimerasa de Bacillus stearothermophilus (Bst)

<400> 40

Met	Lys	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Val	Ala	Tyr	Arg
1				5					10					15	
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Asn	Asp	Lys	Gly	Ile	His	Thr
			20					25					30		
Asn	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Thr	Met	Met	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu
		35					40					45			
Glu	Gln	Pro	Thr	His	Ile	Leu	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr
	50					55					60				
Phe	Arg	His	Glu	Thr	Phe	Gln	Asp	Tyr	Lys	Gly	Gly	Arg	Gln	Gln	Thr
65					70					75					80
Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Phe	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Lys
				85					90				95		
Ala	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Tyr	Glu	Leu	Asp	His	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp
			100					105					110		
Ile	Ile	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Ala	Val
		115					120					125			
Lys	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Gln
	130					135					140				
Val	Thr	Val	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Tyr
145					150					155					160
Thr	Pro	Glu	Thr	Val	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Ile
				165					170					175	
Val	Asp	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	Ser	Asp	Asn	Ile	Pro	Gly
			180					185					190		
Val	Pro	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Phe
		195					200					205			
Gly	Thr	Val	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Glu	Ile	Lys	Gly	Glu
	210					215					220				
Lys	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser
225					230					235					240
Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Ile	Cys	Arg	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Leu
			245						250					255	
Asp	Asp	Ile	Val	Tyr	Lys	Gly	Glu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Leu
		260						265					270		
Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gln	Ser	Phe	Leu	Asp	Lys	Met	Ala	Val	Gln
		275					280					285			
Thr	Asp	Glu	Gly	Glu	Lys	Pro	Leu	Ala	Gly	Met	Asp	Phe	Ala	Ile	Ala
	290					295					300				
Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Glu	Met	Leu	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	Val
305					310					315				320	
Glu	Val	Val	Gly	Asp	Asn	Tyr	His	His	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	Ala
				325					330					335	
Leu	Ala	Asn	Glu	Arg	Gly	Arg	Phe	Phe	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Leu
			340					345					350		
Ala	Asp	Pro	Lys	Phe	Leu	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Glu	Thr	Lys	Lys	Lys
		355					360					365			
Thr	Met	Phe	Asp	Ser	Lys	Arg	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Lys	Trp	Lys	Gly
	370					375					380				
Ile	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Val	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu
385					390					395					400
Leu	Asp	Pro	Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Lys	Met
				405					410					415	
His	Gln	Tyr	Glu	Ala	Val	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Gly
			420					425					430		
Ala	Lys	Arg	Thr	Val	Pro	Asp	Glu	Pro	Thr	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Ala
		435					440					445			
Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Glu	Glu	Pro	Leu	Met	Asp	Glu
	450					455					460				
Leu	Arg	Arg	Asn	Glu	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Gln	Pro
465					470					475					480
Leu	Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Asn	Met	Glu	Phe	Thr	Gly	Val	Lys	Val	Asp
				485					490					495	
Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Gly	Ala	Glu	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Gln

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

<210> 41
 <211> 877
 5 <212> PRT
 <213> Bacillus caldotenax

<220>
 10 <223> ADN polimerasa de Bacillus caldotenax (Bca)

<400> 41

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

Pro Pro Glu Leu Ser Glu Gln Phe Pro Leu Leu Arg Glu Leu Leu Arg
 Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Glu Asn Tyr Glu Ala Asp Asp
 Ile Ile Gly Thr Leu Ala Ala Arg Ala Glu Gln Glu Gly Phe Glu Val
 Lys Val Ile Ser Gly Asp Arg Asp Leu Thr Gln Leu Ala Ser Pro His
 Val Thr Val Asp Ile Thr Lys Lys Gly Ile Thr Asp Ile Glu Pro Tyr
 Thr Pro Glu Ala Val Arg Glu Lys Tyr Gly Leu Thr Pro Glu Gln Ile
 Val Asp Leu Lys Gly Leu Met Gly Asp Lys Ser Asp Asn Ile Pro Gly
 Val Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Val Lys Leu Leu Arg Gln Phe
 Gly Thr Val Glu Asn Val Leu Ala Ser Ile Asp Glu Ile Lys Gly Glu
 Lys Leu Lys Glu Thr Leu Arg Gln His Arg Glu Met Ala Leu Leu Ser
 Lys Lys Leu Ala Ala Ile Arg Arg Asp Ala Pro Val Glu Leu Ser Leu
 Asp Asp Ile Ala Tyr Gln Gly Glu Asp Arg Glu Lys Val Val Ala Leu
 Phe Lys Glu Leu 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 Met Leu Ala Asp Lys Ala Ala Leu Val Val
 Glu Val Val Glu Glu Asn Tyr His Asp Ala Pro Ile Val Gly Ile Ala
 Val Val Asn Glu His Gly Arg Phe Phe 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 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 Asp Arg Leu Leu Val Glu Leu Glu Gln Pro
 Leu Ser Ser Ile Leu 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 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 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
 85 100 115 130 145 150 165 180 195 210 225 235 245 260 275 290 305 325 340 355 370 385 405 420 435 450 465 485 500 515 530 545 565 580 595 610
 90 105 120 135 140 155 170 185 200 215 235 250 265 280 300 315 330 345 360 380 395 410 425 440 455 470 490 505 520 535 550 570 585 600 615

Gln Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala
 625 Phe Val Pro Ser Glu 630 Ser Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr 640
 645 Ser Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu
 660 Met Glu Ala Phe Arg Arg Asp Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met
 675 Asp Ile Phe Gln Val Ser Glu 680 Asp Glu Val Thr Pro Asn Met Arg Arg
 690 Gln Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr
 705 Gly Leu Ala Gln Asn 710 Leu Asn Ile Ser Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe
 725 Ile Glu Arg Tyr 740 Glu Ser Phe Pro Gly Val Lys Arg Tyr Met Glu
 745 Asn Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu
 755 His Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val
 770 Arg Ser Phe Ala Glu Arg Met Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser
 785 Ala Ala Asp Ile Ile 790 Lys Lys Ala Met Ile Asp Leu Asn Ala Arg Leu
 805 Lys Glu Glu Arg Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu
 820 Leu Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Met Glu Arg Leu Cys Arg Leu
 835 Val Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Thr Leu Arg Val Pro Leu Lys
 850 Val Asp Tyr His Tyr Gly 855 Ser Thr Trp Tyr Asp Ala Lys
 865 870

<210> 42

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> motivo sintético de dominio de ADN polimerasa

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)...(3)

15

<223> Xaa = Lys, Arg o Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)...(4)

20

<223> Xaa = Asn, ser o Gly

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)...(6)

25

<223> Xaa = Gly, Ala, Leu, Met, Trp, Pro, Ser, Thr, Phe, Cys, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Val, Ile o His

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)...(7)

30

<223> Xaa = Val, Ile o Leu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)...(8)

35

<223> Xaa = Asp o Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)...(9)

40

<223> Xaa = Pro, Ala, Thr, ser o Gly

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)...(10)

ES 2 536 978 T3

<223> Xaa = Leu o Ile

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (11)...(11)

<223> Xaa = Pro o Leu

<400> 42

10

Lys Leu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. ADN polimerasa que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 y que presenta una actividad incrementada de discriminación de no correspondencias 3' en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que la ADN polimerasa comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende K-L-K-X₂-T-X₃-X₄-D-P-L-P, en la que:
- 10 X₂ es S o N,
X₃ es C o N,
y X₄ es V o I (SEC ID nº 11),
y en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEC ID nº 1 es G y en la que la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido X₃ de la ADN polimerasa de control es Y.
- 15 2. ADN polimerasa según la reivindicación 1, en la que la polimerasa presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a SEC ID nº 1.
3. ADN polimerasa según la reivindicación 2, en la que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05.
- 20 4. Ácido nucleico recombinante codificante de la ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Método para llevar a cabo la extensión de cebadores, que comprende:
25 poner en contacto una ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con un cebador, un molde polinucleótido y nucleósidos trifosfato bajo condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido.
- 30 6. Kit para producir un cebador extendido, que comprende:
por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Kit según la reivindicación 6, que comprende además uno o más recipientes adicionales seleccionado de entre el grupo que consiste de:
35 (a) un recipiente que proporciona un cebador hibridable, bajo condiciones de extensión de cebadores, con un molde polinucleótido predeterminado,
(b) un recipiente que proporciona nucleótidos trifosfato, y
(c) un recipiente que proporciona un tampón adecuado para la extensión de cebadores.
- 40 8. Mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, por lo menos un cebador, un molde polinucleótido y nucleósidos trifosfato.

Figura 1

Z05	QHRELT [*] TKLK N TY V D P L P GLVHPRTGRLHTRFN (SEC ID n° 12)
Taq	QYRELTKLK S TY I D P L P DLIHPRTGRLHTRFN (SEC ID n° 13)
Tfi	EYRELMK [*] LK S TY I D P L P RLVHPKTGRLHTRFN (SEC ID n° 14)
Tfl	QYRELT [*] TKLK N TY I D P L P ALVHPKTGRLHTRFN (SEC ID n° 15)
Sps17	EYRELMK [*] LK S TY I D P L P RLVHPKTGRLHTRFN (SEC ID n° 16)
Tth	QHRELT [*] TKLK N TY V D P L P SLVHPRTGRLHTRFN (SEC ID n° 17)
Tca	QHRELT [*] TKLK N TY V D P L P SLVHPNTGRLHTRFN (SEC ID n° 18)
Tma	EYRKIQ [*] LK S TY I D A L P KMNPKTGRIHASEFN (SEC ID n° 19)
Tne	EFRKIL [*] LK S TY I D T L P KLVNPKTGRFHASFH (SEC ID n° 20)
Taf	EYRKYQ [*] LK S TY I D S I P LSINRKTNRVHTTFH (SEC ID n° 21)
Dra	EFRELD [*] KLR G TY L D P I P NLVNPHTGRLHHTFA (SEC ID n° 23)
Bst	HYRQLG [*] KLQ S TY I E G L L KVVHPVTGKVHTMFN (SEC ID n° 24)
Bca	HYRQLG [*] KLQ S TY I E G L L KVVRPDTKKVHTIFN (SEC ID n° 25)
	-----KLX ₁ X ₂ TX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ ----- (SEC ID n° 26)

FIGURA 2

A. Identidades de secuencia en el enzima polimerasa entero (correspondiente a aminoácidos 1-834 de Z05)														
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tth	Sps17	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bst	Bca		
Z05		0.864	0.833	0.859	0.839	0.962	0.958	0.459	0.374	0.368	0.359	0.407	0.408	
Taq	0.864		0.831	0.854	0.836	0.872	0.864	0.468	0.382	0.368	0.351	0.397	0.397	
Tfi	0.833	0.831		0.82	0.991	0.829	0.824	0.45	0.371	0.375	0.353	0.405	0.397	
Tth	0.859	0.854	0.82		0.824	0.853	0.848	0.462	0.381	0.374	0.356	0.397	0.398	
Sps17	0.839	0.836	0.991	0.824		0.835	0.83	0.452	0.375	0.377	0.355	0.407	0.399	
Tca	0.962	0.872	0.829	0.853	0.835		0.989	0.463	0.373	0.367	0.358	0.406	0.406	
Dra	0.958	0.864	0.824	0.848	0.83	0.989		0.46	0.371	0.365	0.356	0.404	0.404	
Tma	0.459	0.468	0.45	0.462	0.452	0.463	0.46		0.334	0.325	0.314	0.338	0.339	
Tne	0.374	0.382	0.371	0.381	0.375	0.373	0.371	0.334		0.854	0.567	0.37	0.377	
Taf	0.368	0.368	0.375	0.374	0.377	0.367	0.365	0.325	0.854		0.558	0.377	0.376	
Bst	0.359	0.351	0.353	0.356	0.355	0.358	0.356	0.314	0.567	0.558		0.356	0.364	
Bca	0.407	0.397	0.405	0.397	0.407	0.406	0.404	0.338	0.37	0.377	0.356		0.881	
	0.408	0.397	0.397	0.398	0.399	0.406	0.404	0.339	0.377	0.376	0.364	0.881		
B. Identidades de secuencia en sólo subdominio de polimerasa (correspondiente a aminoácidos 420-834 de Z05)														
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tth	Sps17	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bst	Bca		
Z05		0.901	0.845	0.891	0.845	0.975	0.973	0.563	0.483	0.478	0.44	0.498	0.49	
Taq	0.901		0.879	0.901	0.877	0.906	0.901	0.561	0.488	0.473	0.44	0.503	0.495	
Tfi	0.845	0.879		0.857	0.997	0.853	0.853	0.566	0.495	0.49	0.449	0.512	0.49	
Tth	0.891	0.901	0.857		0.855	0.889	0.889	0.571	0.492	0.48	0.444	0.494	0.485	
Sps17	0.845	0.877	0.997	0.855		0.853	0.853	0.566	0.495	0.49	0.449	0.512	0.49	
Tca	0.975	0.906	0.853	0.889	0.853		0.99	0.563	0.478	0.473	0.437	0.496	0.488	
Dra	0.973	0.901	0.853	0.889	0.853	0.99		0.563	0.478	0.473	0.437	0.496	0.488	
Tma	0.563	0.561	0.566	0.571	0.566	0.563	0.563		0.45	0.448	0.426	0.474	0.454	
Tne	0.483	0.488	0.495	0.492	0.495	0.478	0.478	0.45		0.883	0.622	0.474	0.475	
Taf	0.478	0.473	0.49	0.48	0.49	0.473	0.473	0.448	0.883		0.615	0.476	0.473	
Bst	0.44	0.44	0.449	0.444	0.449	0.437	0.437	0.426	0.622	0.615		0.46	0.473	
Bca	0.498	0.503	0.512	0.494	0.512	0.496	0.496	0.474	0.474	0.476	0.46		0.898	
	0.49	0.495	0.49	0.485	0.49	0.488	0.488	0.454	0.475	0.473	0.473	0.898		