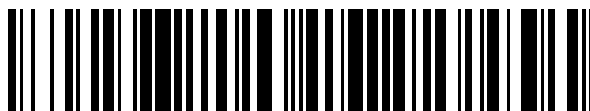


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 155**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2010** **E 10735050 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015** **EP 2456886**

54 Título: **Un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos en reacciones de transcripción inversa y amplificación**

30 Prioridad:

21.07.2009 GB 0912637
19.08.2009 US 235177 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2016

73 Titular/es:

BIOTEC PHARMACON ASA (100.0%)
Strandgaten 3
9008 Tromsø, NO

72 Inventor/es:

ELDE, MORTEN;
LANES, OLAV y
GJELLESVIK, DAG, RUNE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 562 155 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

Un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos en reacciones de transcripción inversa y amplificación

5 La presente invención se refiere a la eliminación de ADN contaminante de mezclas de reacción de transcripción inversa, de preparaciones de ADN polimerasa de arranque en caliente y de mezclas de reacción de PCR de arranque en caliente, a través del uso de una ADNasa. La invención también se refiere a la prevención de resultados positivos falsos en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, a través del uso de una ADNasa, en particular en reacciones de amplificación que implican transcripción inversa de la secuencia diana, una ADN polimerasa de
10 arranque en caliente y/o una preparación de PCR de arranque en caliente barrera. La invención también se refiere a una ADNasa extremadamente termoinestable adecuada para su uso en tales métodos.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tales como las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) son
15 unas de las herramientas más poderosas disponibles en biotecnología, que permiten la preparación de un gran número de copias de una secuencia diana a partir de una muestra que contiene solo una pequeña cantidad de ácido nucleico. En el caso de PCR, los cebadores de oligonucleótido complementarios a sus respectivas hebras de una secuencia diana bicatenaria, se añaden a la mezcla de reacción que contiene la secuencia diana y nucleótidos libres. El ciclado térmico en presencia de una ADN polimerasa da como resultado la amplificación de la secuencia entre los cebadores. La capacidad de los fragmentos amplificados, creados mediante el procedimiento de PCR, para
20 actuar como moldes para ciclos de PCR posteriores da como resultado la rápida producción de una cantidad considerable de la secuencia diana. Incluso una única copia de la secuencia diana puede producir suficiente ácido nucleico para permitir la detección mediante, por ejemplo, hibridación con una sonda marcada o la incorporación de un desoxinucleótido trifosfato marcado con ³²P en los segmentos amplificados.

25 La reacción de amplificación de la ligasa (LAR: siglas del inglés *ligase amplification reaction*), también conocida como reacción en cadena de la ligasa (LCR: siglas del inglés *ligase chain reaction*), como la PCR (siglas del inglés *polymerase chain reaction*), utiliza ciclos repetitivos y temperatura alternas para lograr un aumento exponencial del número de copias de la secuencia diana. En este método, la ADN ligasa cataliza la unión de dos oligonucleótidos complementarios a regiones adyacentes de una de las hebras de ADN diana. También se pueden ligar otros dos
30 oligonucleótidos complementarios a la otra hebra. Después de la desnaturalización, las hebras molde originales y los dos pares ligados pueden actuar como moldes para hibridación y ligación adicionales.

La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA: sigla del inglés *strand displacement amplification*) aprovecha la
35 propiedad de las enzimas involucradas en la reparación de ADN de escisión de ADN para reemplazar un ADN monocatenario mellado en un ADN dúplex con una hebra recién sintetizada. Para crear una hebra monocatenaria mellada con regularidad se utiliza una enzima de restricción endonucleasa, por ejemplo, HindI o BsoBI, que cuando la hebra opuesta está hemifósforotiolada solo mellan el ADN en una hebra de su sitio de reconocimiento. Los cebadores utilizados en este método contienen un sitio de reconocimiento apropiado y se utiliza en la reacción de polimerización dATPaS.

40 La amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA: siglas del inglés *nucleic acid sequence-based amplification*), también conocida como 3SR (autorreplicación de secuencia) es, esencialmente, una versión *in vitro* de la transcripción retroviral natural. 3SR implica transcripción inversa repetitiva a partir del molde de ARN para formar un molde de ADNc. A partir del molde de ADNc una ARN polimerasa produce el ARN correspondiente.

45 La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP: siglas del inglés *loop-mediated amplification method*; Notomi, T., *et al.*, Nuc. Acid Res. 2000 Vol 28 (12) e63) se basa en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de hebra autocíclico. Se utiliza una ADN polimerasa con una elevada actividad de desplazamiento de hebra (por ejemplo, el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst), con cebadores diseñados de forma específica. Este
50 procedimiento implica separación de hebras para exponer nuevas secuencias diana sin la necesidad de fusión de hebras (por lo tanto, el procedimiento es isotérmico).

La transcripción inversa es un procedimiento en el que se transcribe un molde de ARN monocatenario (ARNmc) en
55 un ADN monocatenario complementario. Después, el ADN monocatenario puede utilizarse para formar ADN bicatenario (ADNbc). Algunas enzimas son capaces de producir la primera hebra de ADN y de sintetizar la segunda hebra para formar ADNbc, y otras son específicas para solo una de estas dos etapas. Después, los ADNmc y los ADNbc pueden utilizarse en una diversidad de aplicaciones de biología molecular. Por ejemplo, podrían utilizarse directamente en ensayos de detección basados en sondas (por ejemplo transferencia Southern), en experimentos de secuenciación o en protocolos de clonación. Muy a menudo el ADNc será amplificado adicionalmente en una
60 reacción de amplificación tal como PCR, LCR, SDA, LAMP o 3SR, por ejemplo para proporcionar más material para los experimentos anteriores o para tener la capacidad de cuantificar la cantidad de molde de ARN presente en la muestra original.

Las reacciones de amplificación ligadas a transcripción inversa pueden ser procedimientos de "una etapa" o de "dos
65 etapas". En un procedimiento de una etapa, los componentes de la reacción de transcripción inversa y de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos están presentes en un único recipiente de reacción y, normalmente, las

condiciones tempranas de reacción se seleccionan para permitir que proceda la reacción de transcripción inversa hasta la finalización, y después las condiciones de reacción se cambian a condiciones adecuadas para permitir que proceda la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

En un procedimiento de dos etapas primero se combinan los componentes de la reacción de transcripción inversa y se realiza la reacción de transcripción inversa. Después se combina el producto de la transcripción inversa con los componentes de la reacción de amplificación y se somete a la reacción de amplificación. En un protocolo de dos etapas en "un tubo" los componentes de la reacción de amplificación se añaden al mismo recipiente de reacción en el que se realizó la reacción de transcripción inversa. En un protocolo de dos etapas de "dos tubos" la reacción de amplificación se realiza en un recipiente de reacción nuevo.

La transcripción inversa se puede combinar con cualquiera de PCA, LAMP, LCR, SDA o BSR en un procedimiento de una o de dos etapas. En el caso de SDA deberían elegirse una enzima de desplazamiento de hebra termoestable y una enzima de restricción termoestable (por ejemplo BsoBI).

La capacidad de estas técnicas de amplificación de amplificar cantidades muy pequeñas de una secuencia diana las hace altamente susceptibles a la contaminación por ADN genómico en el caso de secuencias diana de ARN (es decir las reacciones de amplificación a continuación de, o utilizando, transcripción inversa), y por secuencias diana en moléculas de ADN de reacciones de amplificación previas, las que pueden arrastrarse en los reactivos (por ejemplo la polimerasa, los cebadores, el tampón de reacción, etc.), dispositivos de pipeteo, superficies del laboratorio, guantes o aerosolización. Los aerosoles se pueden producir por la perturbación de una solución, tal como durante un vertido o incluso por la perturbación de una pequeña cantidad de material sobre la superficie de un recipiente, tal como el residuo sobre la superficie interna de una tapa de un tubo de plástico, que se puede aerosolizar cuando el tubo se abre. Cuando la muestra de ácido nucleico se investiga por razones de diagnóstico médico, o forenses, puede tener una gran repercusión el impacto de los resultados positivos falsos que provoca la introducción accidental en la mezcla de reacción de ácido nucleico que pueda comprender a la secuencia diana, conocido como contaminación por arrastre.

Las técnicas de PCR cuantitativa son reacciones de amplificación de una particular susceptibilidad a los efectos perjudiciales de la contaminación de ácidos nucleicos, ya que estas tienen el poder de cuantificar menos de 20 copias de una secuencia de ADN en una reacción. Por lo tanto, incluso los más pequeños niveles de contaminación de ácidos nucleicos pueden proporcionar resultados falsos en las técnicas de PCRc (PCR cuantitativa). Además, estos métodos necesitan la detección de señales de los ácidos nucleicos diana amplificados por encima de una señal de fondo inevitable. El ácido nucleico contaminante puede contribuir a esta señal de fondo y así reducir la sensibilidad de la técnica. Como tal, minimizar el ácido nucleico contaminante maximiza la sensibilidad de un experimento de PCR cuantitativa. En experimentos donde se detectan números pequeños de copias de los ácidos nucleicos diana, por ejemplo, diagnóstico de patógenos y cuantificación de la carga de patógeno basados en PCR cuantitativa, es esencial que se maximice la sensibilidad de la PCR cuantitativa y que se minimicen los positivos falsos. En el campo de la identificación y el diagnóstico de bacterias, donde son diana de técnicas de PCRc segmentos de ADN bacteriano altamente conservados (por ejemplo, los genes ARNr16S o ARNr23), es un problema principal la contaminación ácidos nucleicos derivada de la preparación de ADN polimerasa (que se obtiene normalmente a partir de bacterias y de sistemas de expresión bacterianos). Por lo tanto, se necesitan métodos para eliminar de forma eficaz contaminantes de ácidos nucleicos bacterianos de las preparaciones de ADN polimerasa. Se buscan de forma especial métodos que puedan lograr esto sin tener un impacto perjudicial sobre las reacciones de amplificación aguas abajo, y sin dañar la polimerasa.

Se han desarrollado diversas técnicas para evitar o limitar los efectos de la contaminación por arrastre. En el caso de la PCR, estas incluyen cebadores anidados, cebadores que hibridan con la secuencia diana dentro de los límites de hibridación de los dos cebadores utilizados para iniciar la PCR (K.B. Mullis *et al.* Cold Spring Harbour Symposia Vol. LI, páginas 263-273, 1986). El producto de PCR amplificado más corto de los cebadores anidados no puede hibridar con los cebadores iniciales, de modo que si es este producto el que se arrastra, el uso de los cebadores iniciales no amplificará esta contaminación por arrastre. Sin embargo, la contaminación por arrastre no se ha eliminado, y si se utilizan los mismos cebadores anidados en una PCR posterior se amplificará el producto de los cebadores anidados, amplificado de forma previa.

Se han desarrollado métodos que implican la incorporación del nucleótido deoxiuridina trifosfato (dUTP) en lugar de deoxitimidina trifosfato (dTTP) en secuencias de ácidos nucleicos transcritas de forma inversa /amplificadas. Como la deoxiuridina (dU) normalmente no se encuentra en ADN de origen natural, esta base distingue amplicones producidos de forma previa, de nuevas secuencias diana. Antes del comienzo de reacciones de transcripción inversa/amplificación adicionales, la mezcla de reacción de amplificación se puede tratar con la enzima uracilo ADN glicosilasa (UAG), que elimina la base uracilo dejando intacto el esqueleto de azúcar fosfodiéster, produciendo un sitio abásico en el ADN monocatenario (mc) y bicatenario (bc) (documento US-A-5.418.149). La temperatura de la mezcla de la reacción de amplificación se eleva para escindir el ADN en los sitios abásicos, lo que da como resultado la degradación de la contaminación por arrastre.

Este método tampoco está exento de problemas, dado que la introducción de dUTP en el producto de transcripción inversa/amplificación puede interferir con análisis posteriores del producto, por ejemplo mediante escisión por enzima de restricción o por PCR (la eficacia de la polimerización se puede reducir y el uso de las polimerasas correctoras de errores está excluido). Además, la UAG debería inactivarse de forma irreversible o, de lo contrario, los productos de reacciones posteriores de transcripción inversa/ PCR se degradarán. La temperatura elevada es un mecanismo común para inactivar las enzimas UAG, pero muchas de las enzimas UAG disponibles de forma comercial hasta la fecha no se inactivan satisfactoriamente incluso después de la exposición a las temperaturas de una reacción de PCR. Para minimizar el impacto de la actividad residual de la UAG, las etapas de temperatura utilizadas en la reacción de amplificación deben estar por encima de los 54 °C y el recipiente de reacción debe mantenerse a altas temperaturas o congelarse de forma inmediata, para evitar que se degraden las amplificaciones recién producidas, que también contendrán uracilo. Recientemente se ha descrito una UAG de bacalao que se puede inactivar completamente de forma irreversible cuando se incuba a 50 °C durante 10 minutos y esto ha hecho más ampliamente aplicables las estrategias basadas en la UAG.

Sin embargo, una limitación adicional para cualquier sistema de UAG es que no puede librar a la mezcla de reacción del ADN genómico contaminante debido a que el ADN genómico no tendrá la modificación del uracilo. Por consiguiente, los sistemas de UAG no son capaces de abordar la contaminación de ADN genómico de las reacciones de transcripción inversa.

También se ha sugerido que las mezclas de reacción de PCR individuales sean tratadas antes de la adición del ADN diana y de la ADN polimerasa Taq, con ADNasa I o con endonucleasas de restricción que cortan de forma interna a la secuencia diana, evitando así la amplificación de ADN contaminante (Furrer *et al.* Nature. Vol. 346 page 324, 1990). De forma semejante, se pueden tratar de este modo las mezclas de reacción de transcripción inversa antes de la adición de la transcriptasa inversa. Este método necesita un tiempo de descontaminación de 30 minutos y, para inactivar la ADNasa I o la endonucleasa de restricción, después de la descontaminación la mezcla de reacción se llevan a ebullición. Debido a esta etapa de ebullición, es necesario añadir la ADN polimerasa o la transcriptasa inversa después de la descontaminación. Claro está, esto representa un riesgo adicional de introducción de contaminación por arrastre en la mezcla de pre-amplificación/pre-transcripción inversa, y la descontaminación de la propia ADN polimerasa está impedida. En este método deben utilizarse concentraciones de cebadores de 1 µM debido a la actividad de la ADNasa I hacia ADN monocatenario.

También se han descrito ADNasas que son más termoinestables. El documento WO99/007887 divulga una ADNasa aislada de *Pandalus borealis* que se inactiva irreversiblemente de forma sustancial después de 2 minutos a 94 °C. Esta misma enzima también se inactiva de irreversiblemente de forma sustancial después de 15 minutos a 65 °C. Anisimova *et al.* (Biotechnology Letters; 2009, 31: 251 a 257) describe una versión de la ADNasa de cangrejo rojo gigante (centollo de Kamchatka, *Paralithodes camtschaticus*) mutada aleatoriamente, que se inactiva después de la incubación durante 10 minutos a 65 °C, aunque la inactivación se puede lograr a temperaturas tan bajas como 5 °C después de 10 minutos si se utilizan los aditivos de inactivación DTT (1-4 ditiotretitol) y EDTA.

El EDTA es un agente quelante de iones metálicos y por tanto puede interferir con la acción de enzimas que son sensibles a la concentración de iones metálicos. Anisimova indica que la actividad de la ADNasa del cangrejo rojo gigante está influenciada de forma positiva por los iones Mg^{2+} , y de tal manera el EDTA contribuye a su inactivación mediante el secuestro de este activador. Las ADN polimerasas son también muy sensibles a la concentración de iones metálicos y, en particular, debe ser controlado de forma cuidadosa el contenido de Mg^{2+} de las mezclas de reacción de polimerasa. Como resultado, el uso de EDTA en una etapa de inactivación de la ADNasa tiene el potencial de inhibir de forma directa la actividad de las reacciones de la polimerasa aguas abajo. Por lo tanto, es preferible no utilizar EDTA en las etapas de procesamiento que preceden una reacción de polimerasa (por ejemplo transcripción inversa, PCR, SDA, 3SR).

Como la ADNasa mutante de cangrejo rojo gigante proporcionada por Anisimova necesita la presencia de EDTA para permitir que se produzca la inactivación a temperaturas por debajo de 65 °C, esta ADNasa no es adecuada para su uso en una etapa de eliminación de contaminantes de ADN que preceda a la reacción de transcripción inversa (que normalmente se realiza a alrededor de 50 °C). Para permitir que esta enzima se utilizada sin el riesgo de la inhibición por EDTA de pasos aguas abajo, debe haber una etapa de inactivación donde la mezcla se caliente por encima de 65 °C. Como esto está por encima de la temperatura normal de la reacción de transcripción inversa, esta etapa estará separada y añadida a la etapa de transcripción inversa. Esto añade una etapa adicional al proceso, aumentando de este modo la complejidad y laboriosidad del procedimiento en el que también, en el campo de la biología molecular, donde el procedimiento se puede repetir muchas veces, representa una desventaja significativa en términos de costes de energía y de tiempo de uso de equipos. Además, a menos que la transcriptasa inversa se añada después del tratamiento con ADNasa y de su inactivación, la ADNasa estará activa durante la etapa de transcripción inversa y, así, hay riesgo de que el producto de ADNc se degrade. La adición posterior de la transcriptasa inversa a la mezcla de reacción, representaría una oportunidad para que se produzca la contaminación y una complicación en el proceso en su conjunto, otra vez con implicaciones de coste.

Los presentes inventores se han dado cuenta que una ADNasa que se puede inactivar sustancialmente de forma irreversible a temperaturas compatibles con la etapa de transcripción inversa, y que sea sustancialmente específica

para ADN bicatenario, proporcionaría un método altamente eficaz y eficiente. Sin embargo, no hay actualmente una ADNasa disponible con estas propiedades. Tal ADNasa podría utilizarse para descontaminar una mezcla de reacción completa de transcripción inversa (es decir una mezcla de reacción que contiene todos los componentes básicos necesarios para que se produzca la transcripción inversa de una molécula de ARN) inmediatamente antes de la reacción de transcripción inversa y después, durante la iniciación de la reacción de transcripción inversa (es decir, elevación de la temperatura de la mezcla de reacción a la temperatura de trabajo de la enzima de transcripción inversa elegida, por ejemplo 50 °C o por encima) la ADNasa sería inactivada sustancialmente de forma irreversible en el curso de la reacción de transcripción inversa (produciéndose la mayoría de la inactivación, de forma ideal, en los primeros minutos de la reacción). Este curso temporal de la inactivación es importante dado que significa que el ADNc recién formado no se degradaría mediante la ADNasa. A diferencia de una ADNasa con una mayor temperatura de inactivación, tal ADNasa no necesitaría una etapa de inactivación separada y/o la adición posterior de transcriptasa inversa.

Ahora los presentes inventores han producido una enzima con estas propiedades únicas. Al igual que todas las ADNasas, la ADNasa extremadamente termoinestable de la invención digiere ADN mediante la escisión de uniones fosfodiéster del esqueleto de azúcar fosfato del ácido nucleico.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos de una reacción de transcripción inversa que comprende el uso de una ADNasa según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Preferentemente estas características de inactivación se logran en ausencia de EDTA.

Por lo tanto, la ADNasa de la invención se utiliza para degradar ADN bicatenario contaminante presente en la mezcla de reacción de la transcripción inversa o que está presente en los componentes individuales de la misma. De este modo, se puede reducir o evitar el ADN contaminante en el producto de transcripción inversa (que podría amplificarse y de este modo proporcionar resultados positivos falsos si así se utiliza el producto de la transcripción inversa) y también se puede reducir o evitar la transcripción inversa no específica.

En particular, el método implica poner en contacto la mezcla de reacción de la transcripción inversa, o los componentes individuales de la misma, con la ADNasa de la invención en condiciones que permiten la digestión de cualquier ADN bicatenario en ella, y después calentar dicha mezcla de reacción, o los componentes individuales de la misma, para inactivar dicha ADNasa. Preferentemente la mezcla de reacción es una mezcla de reacción completa (es decir, que incluye cebadores de ADN) y, preferentemente, la mezcla de reacción completa se calienta a una temperatura que corresponde a la temperatura de trabajo de la enzima de transcripción inversa contenida en la misma.

En otra realización la reacción de transcripción inversa está seguida de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo PCR, LCR, SDA, 3SR, LAMP). Preferentemente, PCR, LCR o LAMP siguen a la reacción de transcripción inversa. En una realización muy preferente la reacción de amplificación es PCR.

En otra realización la reacción de transcripción inversa y la reacción de amplificación se realizan como un procedimiento de una etapa, es decir, el recipiente de reacción tiene todos los componentes de la reacción de transcripción inversa y de la reacción de amplificación presentes al mismo tiempo. Sin embargo, también se pueden utilizar los procedimientos de dos etapas. En tales realizaciones, los diversos componentes de las mezclas de reacción y de reacción parcial se pueden tratar de forma individual con la ADNasa de la invención.

Visto de forma alternativa, este aspecto de la invención proporciona el uso de una ADNasa como se define en las reivindicaciones, en la eliminación de la contaminación de ácidos nucleicos de una reacción de transcripción inversa, en el que preferentemente la reacción de transcripción inversa se sigue de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo transcripción inversa - PCR. Preferentemente estas características de inactivación de la ADNasa se logran en ausencia de EDTA.

Como se menciona anteriormente, la invención tiene particular utilizar en evitar o limitar la contaminación con ADN genómico y la contaminación por arrastre, y en particular en evitar o reducir los resultados positivos falsos debidos a la contaminación por arrastre y/o a la contaminación con ADN genómico.

En un aspecto adicional la invención también proporciona un método para evitar o reducir resultados positivos falsos debidos a la contaminación con ADN genómico y/o a la contaminación por arrastre en reacciones de transcripción inversa, comprendiendo dicho método utilizar una ADNasa que se inactiva de forma sustancialmente irreversible mediante calentamiento a una temperatura de aproximadamente 50 °C durante 5 minutos, y que es sustancialmente específica para ADN bicatenario, para degradar ADN genómico contaminante y/o ADN bicatenario contaminante por arrastre, presentes en la mezcla de reacción de la transcriptasa inversa o en los componentes individuales de la misma. Preferentemente, estas características de inactivación de la ADNasa se logran en ausencia de EDTA.

La ADNasa de la invención también es adecuada para su uso en la eliminación o reducción de contaminación por arrastre en todas las reacciones de amplificación. Esto es debido a que cuanto menor es la temperatura de inactivación de la ADNasa, más fácil es inactivarla durante el procedimiento de amplificación utilizado en la etapa de inactivación, que puede ser de forma conveniente la etapa de desnaturalización del ADN (por ejemplo a 94 °C durante 5 minutos) para los protocolos de amplificación de ADNbc.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que comprende el uso de la ADNasa de la invención.

Por lo tanto, la ADNasa de la invención se utiliza para degradar ADN bicatenario que no sea diana presente en la mezcla de reacción de amplificación o en los componentes individuales de la misma. De este modo se puede reducir o evitar la amplificación no específica.

En particular, el método implica poner en contacto la mezcla de reacción de amplificación, o los componentes individuales de la misma, con la ADNasa de la invención en condiciones que permitan la digestión de cualquier ADN bicatenario en ella; calentar dicha mezcla de reacción, o los componentes individuales de la misma, para inactivar dicha ADNasa y posteriormente poner dicha mezcla, o los componentes individuales de la misma, en contacto con dicho ácido nucleico diana a amplificar.

Visto de forma alternativa, este aspecto de la invención proporciona el uso de la ADNasa de la invención en la eliminación de la contaminación de ácidos nucleicos de una mezcla de reacción de amplificación.

Como se menciona anteriormente, la invención tiene particular utilidad en evitar o limitar la contaminación por arrastre en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, y en particular en evitar o reducir resultados positivos falsos debidos a la contaminación por arrastre.

En un aspecto adicional la invención también proporciona un método para evitar o reducir resultados positivos falsos debidos a la contaminación por arrastre en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho método utilizar la ADNasa de la invención para degradar ADN bicatenario que no sea diana arrastrado, presente en la mezcla de reacción de amplificación, o en los componentes individuales de la misma.

La ADNasa de la presente invención también puede usarse para eliminar contaminantes de ácidos nucleicos de preparaciones de ADN polimerasa, así como utilizarse para eliminar contaminantes de ácidos nucleicos de mezclas de reacción de amplificación que comprendan una ADN polimerasa. La baja temperatura de inactivación de la ADNasa de la presente invención significa que la inactivación de la ADNasa después de la descontaminación se puede lograr sin tener un, o teniendo un mínimo, impacto perjudicial sobre la polimerasa.

La invención es particularmente adecuada para la eliminación de contaminación de ácidos nucleicos de las así llamadas ADN polimerasas de arranque en caliente. Se han desarrollado numerosas polimerasas de arranque en caliente. El objetivo detrás de las ADN polimerasas de arranque en caliente es modificar la polimerasa para evitar que la enzima actúe como una ADN polimerasa (la capacidad de elongar una secuencia de polinucleótidos cebada) hasta que la mezcla de reacción de amplificación alcance temperaturas que se aproximan a la temperatura catalítica óptima de la ADN polimerasa, o al menos temperaturas a las que la hibridación del cebador es suficientemente específica de secuencia como para evitar o minimizar la amplificación no específica. Esto es debido a que, a menores temperaturas, los cebadores pueden hibridar de forma no específica con la muestra de ácido nucleico y dar lugar a productos de amplificación no específicos que pueden proporcionar resultados falsos y/o tener efectos inhibidores sobre la reacción. Además, en algunos casos la actividad de la polimerasa es menos precisa y pueden presentarse errores de secuencia en los productos de la amplificación. Esta especificidad aumentada hace a las polimerasas de arranque en caliente especialmente adecuadas para su uso en PCR cuantitativa.

Una estrategia para crear ADN polimerasas de arranque en caliente es incorporar grupos termoinestables a la polimerasa que, cuando se incorporan, inhiben o evitan la acción catalítica de la polimerasa, pero que se disocian de la polimerasa a temperaturas que se aproximan a la temperatura catalítica óptima de la polimerasa, o al menos a temperaturas a las que la hibridación del cebador es suficientemente específica de secuencia como para evitar o minimizar la amplificación no específica.

Los grupos termoinestables adecuados incluyen anticuerpos y aficuerpos específicos de polimerasa, otras proteínas de unión a polimerasa específicas, aptámeros de oligonucleótido específicos, revestimientos no específicos (por ejemplo, cera), y modificaciones químicas covalentes de los aminoácidos de la polimerasa (por ejemplo, los aminoácidos en el sitio activo). La descontaminación de tales polimerasas con una ADNasa que se inactiva por encima de la temperatura de activación de arranque en caliente de la polimerasa de arranque en caliente, significaría que las propiedades de arranque en caliente de la polimerasa de arranque en caliente serían afectadas de forma perjudicial. La presente invención permite, de forma ventajosa, la eliminación de contaminantes de ADN en preparaciones de polimerasas de arranque en caliente con una ADNasa, y la posterior inactivación de la ADNasa a temperaturas que están por debajo de la temperatura de activación de arranque en caliente de las polimerasas de

arranque en calientes típicas y, así, puede evitarse el impacto perjudicial sobre las propiedades de arranque en caliente de las polimerasas de arranque en caliente.

Las polimerasas de arranque en caliente discutidas anteriormente son solo una estrategia para realizar PCR de arranque en caliente. Otras estrategias evitan que uno o más componentes de la mezcla de reacción de PCR se pongan en contacto con los componentes restantes. Normalmente la polimerasa o el ácido nucleico diana están aislados detrás de, o en, un material (normalmente lípido, por ejemplo una cera) con un punto de fusión a una temperatura que se aproxima a la temperatura catalítica óptima de la polimerasa, o al menos a una temperatura a la que la hibridación del cebador es suficientemente específica de secuencia como para evitar o minimizar la amplificación no específica. Por lo tanto, la ADNasa de la invención también permite eliminar contaminación de ácidos nucleicos de estas así llamadas preparaciones de PCR de arranque en caliente "barrera", sin impacto perjudicial sobre este tipo de PCR de arranque en caliente.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos de una PCR de arranque en caliente, en el que dicha reacción es una preparación de PCR de arranque en caliente barrera y/o implica una ADN polimerasa de arranque en caliente, cuyo método comprende el uso de la ADNasa de la invención.

Por lo tanto, la ADNasa de la invención se utiliza para degradar ADN bicatenario que no sea diana presente en la preparación/mezcla de reacción de PCR de arranque en caliente. De este modo se puede reducir o evitar la amplificación no específica.

En particular, el método implica poner en contacto la preparación/mezcla de reacción de la PCR de arranque en caliente con la ADNasa de la invención en condiciones que permitan la digestión de cualquier ADN bicatenario en la misma; calentar dicha preparación/mezcla de reacción para inactivar dicha ADNasa, y posteriormente provocar que dicho ácido nucleico diana a amplificar se ponga en contacto con los restantes componentes de la preparación/mezcla de reacción.

Visto de forma alternativa, este aspecto de la invención proporciona el uso de la ADNasa de la invención en la eliminación de la contaminación de ácidos nucleicos de una reacción de PCR de arranque en caliente, en el que dicha reacción es una reacción de arranque en caliente barrera y/o implica a una polimerasa de arranque en caliente.

La invención también tiene particular utilidad en evitar o limitar la contaminación por arrastre en reacciones de PCR de arranque en caliente, en el que dichas reacciones son reacciones de arranque en caliente barrera y/o implican a una ADN polimerasa de arranque en caliente, y en particular en evitar o reducir resultados positivos falsos debidos a contaminación por arrastre.

En un aspecto adicional la invención también proporciona un método para evitar o reducir resultados positivos falsos debidos a contaminación por arrastre en reacciones de PCR de arranque en caliente, en el que dichas reacciones son reacciones de arranque en caliente barrera y/o implican a una ADN polimerasa de arranque en caliente, comprendiendo dicho método utilizar la ADNasa de la invención para degradar ADN bicatenario que no sea diana arrastrado, presente en la preparación/mezcla de reacción de PCR de arranque en caliente.

La invención también proporciona un método para eliminar la contaminación de ácidos nucleicos de una preparación de ADN polimerasa de arranque en caliente que comprende el uso de la ADNasa de la invención. También se proporciona el uso de una ADNasa de la invención en este método.

Por lo tanto la ADNasa de la invención se usa para degradar ADN bicatenario presente en la preparación de ADN polimerasa de arranque en caliente. En particular, el método implica poner en contacto la preparación de ADN polimerasa de arranque en caliente con la ADNasa de la invención, en condiciones que permitan la digestión de cualquier ADN bicatenario presente en la preparación de ADN polimerasa, y después calentar la preparación para inactivar dicha ADNasa.

La presente invención también proporciona un método de amplificación *in vitro*, la transcripción inversa o amplificación de PCR de arranque en caliente de un ácido nucleico diana, en el que dicha PCR de arranque en caliente es una reacción de arranque en caliente barrera y/o implica a una ADN polimerasa de arranque en caliente, caracterizado por que dicho método incluye una etapa de tratamiento de la mezcla de reacción, de la preparación de reacción, o de los componentes individuales de la misma con la ADNasa de la invención antes del comienzo de la reacción de amplificación o de transcripción inversa existente.

"Transcripción inversa" es el procedimiento por el cual una ADN polimerasa ARN-dependiente cataliza la formación de una molécula de ADN complementaria a un molde de ARN (ADNc). Más específicamente, la polimerasa cataliza la polimerización de deoxirribonucleósidos trifosfato en una secuencia que es complementaria (es decir, siguiendo las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick) a una secuencia de ARN molde cebada.

Se han identificado numerosas enzimas que tienen la capacidad de catalizar esta reacción y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, la transcriptasa inversa de VIH, la transcriptasa inversa de VMA, la transcriptasa inversa de VLM-M, la polimerasa *C. therm.* y la polimerasa Tth. Estas enzimas tienen un intervalo de temperaturas de trabajo óptimo. Las aisladas de organismos tales como virus que infectan animales hospedadores tienen una temperatura de trabajo óptima de alrededor de 37 °C. Sin embargo, se han identificado transcriptasas inversas termoestables y también se han producido mediante mutación de transcriptasas inversas de tipo silvestre, y son estas enzimas termoestables las enzimas que se usan normalmente en reacciones de transcriptasa inversa en el laboratorio. En el extremo inferior del espectro está VMA, con un intervalo de trabajo de 42 a 60 °C, mientras que la actividad de transcriptasa inversa de la ADN polimerasa Tth y de la ADN polimerasa *C. therm.* tiene intervalos de trabajo de 55 a 70 °C y de 60 a 70 °C, respectivamente.

En su forma más básica una mezcla de reacción de transcripción inversa completa contendrá una enzima de transcripción inversa, un molde de ARN, cebadores adecuados que se pueden unir al molde y a partir de los que la transcriptasa inversa puede comenzar la polimerización, dNTPs y un tampón adecuado. La incubación de la mezcla a la temperatura de trabajo de la transcriptasa inversa da como resultado la producción de ADNc. Después de la finalización de la reacción de transcripción inversa el ADNc se puede usar directamente en secuenciación o en experimentos de genotipado, o quizás en protocolos de clonación o de detección.

Por “enzima de transcripción inversa” se entiende cualquier enzima que tenga actividad de transcriptasa inversa (es decir, la capacidad de catalizar la polimerización de un homólogo de ADN complementario a una secuencia molde de ARN cebada, o actividad ADN polimerasa ARN dependiente). Esta actividad puede ser la única actividad de la enzima o, más normalmente, puede ser una actividad componente de una enzima (por ejemplo, transcriptasa inversa de VIH, transcriptasa inversa de VLM-M, transcriptasa inversa de VMA, ADN polimerasa Tth, *C. therm.* polimerasa). Las actividades adicionales normales que puede tener la polimerasa incluyen ARNasa H, ADN polimerasa dirigida por ADN, actividad desenrolladora ADN-ARN, endonucleasa dependiente de Mn^{2+} . Sin embargo, preferentemente la actividad ARNasa H y/o endonucleasa será mínima o estará ausente.

Una “preparación de enzima de transcripción inversa” es cualquier material normalmente una solución, en general acuosa, que comprende una enzima de transcripción inversa. En particular, se refiere a preparaciones preparadas de forma comercial de una enzima de transcripción inversa, es decir un reactivo de enzima de transcripción inversa que puede suministrar un proveedor comercial de enzimas de laboratorio, aunque también están abarcadas en esta expresión versiones diluidas, ajustadas y/o modificadas de tales preparaciones. La preparación de enzima de transcripción inversa también puede ser una preparación de una enzima de transcripción inversa que se haya obtenido de una fuente bacteriana que expresa la enzima de transcripción inversa de forma natural y/o que comprende un casete de expresión que codifica la enzima de transcripción inversa. La preparación puede estar purificada hasta el punto que se compara con la preparación inicial de enzima de transcripción inversa, tomada directamente de la fuente bacteriana.

La expresión “reacción de amplificación de ácidos nucleicos” se refiere a cualquier medio *in vitro* para aumentar el número de copias de una secuencia de ácido nucleico diana. Preferentemente, los métodos implicarán “ciclado térmico”, es decir que involucran ciclado de alta temperatura. Los métodos de amplificación incluyen, pero sin limitación, PCR y modificaciones de ella, 3SR, SDA, LAR o LCR y LAMP, y modificaciones de ellos. PCR, LAMP y LCR, y sus modificaciones, son métodos de ciclado térmico. Los métodos pueden dar como resultado un aumento lineal o exponencial del número de copias de la secuencia diana. “Modificaciones” abarca, pero sin limitación, amplificación en tiempo real, amplificación cuantitativa y semicuantitativa, amplificación competitiva, y etc.

El ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN dependiendo del método de amplificación seleccionado. Por ejemplo, para PCR la diana es ADN, aunque cuando se combina con una etapa de transcripción inversa puede considerarse que la diana es una secuencia de ARN. 3SR amplifica secuencias diana de ARN de forma directa.

La expresión “mezcla de reacción de amplificación/transcripción inversa” se refiere a cualquier solución, en general acuosa, que comprende los diversos reactivos utilizados para amplificar/transcribir de forma inversa un ácido nucleico diana. Estos incluyen enzimas, tampones acuosos, sales y nucleósidos trifosfato. La expresión se refiere a mezclas que contienen todos los componentes necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación satisfactoria y a mezclas que están incompletas, y por lo tanto contienen solo algunos (por ejemplo al menos 2, 3 o 4) de los componentes necesarios. Si se precede con el término “completa” la mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios para la transcripción inversa y/o la amplificación.

Una “ADN polimerasa de arranque en caliente” es una ADN polimerasa que se ha modificado, normalmente mediante la adición de entidades moleculares termoinestables, para aumentar la temperatura a la que puede realizar polimerización detectable de un polinucleótido de ADN cebado. La temperatura a la que la ADN polimerasa de arranque en caliente puede realizar niveles detectables de polimerización de ADN, preferentemente se aproxima a la temperatura catalítica óptima de la polimerasa.

La expresión “preparación de ADN polimerasa de arranque en caliente” se refiere a cualquier material, normalmente una solución, en general acuosa, que comprende una ADN polimerasa de arranque en caliente. En particular, se

refiere a preparaciones preparadas de forma comercial de ADN polimerasa de arranque en caliente, es decir un reactivo de ADN polimerasa de arranque en caliente que puede suministrar un proveedor comercial de enzimas de laboratorio, aunque esta expresión también abarca versiones de tales preparaciones diluidas, ajustadas y/o modificadas. La preparación de ADN polimerasa de arranque en caliente también puede ser una preparación de una ADN polimerasa de arranque en caliente que se ha obtenido a partir de una fuente bacteriana que expresa la polimerasa natural y/o que comprende un casete de expresión que codifica la polimerasa. La preparación puede purificarse hasta el punto que se compara con la preparación de polimerasa inicial tomada de forma directa de la fuente bacteriana. Normalmente, la preparación también estará tratada para aplicar a la polimerasa entidades bloqueantes de arranque en caliente.

Una "reacción de PCR de arranque en caliente" es una reacción de amplificación de PCR en la que la polimerización detectable a partir de un polinucleótido de ADN cebado solamente se produce a una temperatura que se aproxima a la temperatura catalítica óptima de la polimerasa. Las temperaturas preferentes de polimerización detectable deberían interpretarse de forma consistente con la discusión de ADN polimerasas de arranque en caliente.

Una "mezcla de PCR de arranque en caliente" es una mezcla de reacción de PCR según se define anteriormente, que comprende una polimerasa de arranque en caliente.

Una "preparación de PCR de arranque en caliente barrera" es un recipiente de reacción que comprende dos o más componentes de una mezcla de reacción de PCR en el que al menos un componente está aislado de otro componente (o componentes) detrás de, o en, un material con una temperatura de fusión que corresponde a temperaturas de polimerización de ADN detectable según se define anteriormente. Preferentemente el material es un lípido, por ejemplo una cera.

Por "contaminación" se entiende la presencia en la mezcla de reacción de un ácido nucleico que puede funcionar como un molde para transcripción inversa y/o amplificación que no es una parte de la población de ácido nucleico que es diana de la transcripción inversa/amplificación. Los cebadores que se utilizan en la mezcla de reacción no son contaminantes.

La expresión "eliminar contaminación de ácidos nucleicos" está destinada a cubrir la prevención y reducción de la contaminación de ácidos nucleicos.

La expresión "contaminación por arrastre" se utiliza para describir cualquier ácido nucleico que se introduce en una mezcla de reacción de forma accidental o no intencionada, en particular secuencias diana arrastradas de reacciones previas de amplificación o de transcripción inversa.

La expresión "resultado positivo falso" se refiere a un resultado que parece mostrar que la muestra de ácido nucleico investigada contiene la secuencia diana pero en el que el producto amplificado se obtiene de contaminación por arrastre y/o en el caso de reacciones de amplificación basadas en transcripción inversa, posiblemente de ADN genómico. Claramente, la reducción de los resultados positivos falsos que proporciona la invención, es particularmente ventajosa en el campo forense y en el de diagnóstico. Los métodos de la invención permiten aumentar la especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos.

El término "ADNasa" se refiere a una enzima que hidroliza un enlace fosfodiéster en el esqueleto de ADN y no es específica de secuencia de nucleótidos.

Por "inactivada de forma sustancialmente irreversible" se entiende que con calentamiento, la enzima está inactivada al menos el 95 %, preferentemente inactivada el 98 %, más preferentemente la enzima está inactivada el 100 %. El porcentaje de inactivación se puede medir de forma conveniente mediante la incubación de una muestra de ADN (por ejemplo, producto de PCR de 500 pb) durante 3 horas con una ADNasa inactivada o con una ADNasa no inactivada en un tampón adecuado (por ejemplo Tris, HEPES, PBS) a 37 °C; separando los productos de la reacción en un gel de agarosa con bromuro de etidio mediante electroforesis, y midiendo las intensidades relativas de fluorescencia de las bandas de ADN bajo luz UV (Ejemplo 2). Los expertos podrían idear métodos alternativos para medir las actividades relativas de la ADNasa inactivada y no inactivada. Por ejemplo, podrían utilizarse los cambios relativos en la fluorescencia de muestras de ADN que contienen verde SYBR. Los métodos adicionales son el ensayo de Kunitz (Kunitz, M; 1950, S. Gen Physiol, 33: 363 y el Ejemplo 1) y el ensayo de Kunitz modificado ideado por Yamamoto (Yamamoto, M; 1971, Biochim Biophys Acta, 228: 95 y el Ejemplo 4).

Incluso cuando la temperatura de la mezcla de reacción vuelve a la temperatura ambiente, la ADNasa no recupera su actividad y no hay actividad sustancialmente residual; de forma específica, menos del 5 %, preferentemente menos del 2 %, muy preferentemente no queda actividad detectable de la ADNasa.

Preferentemente, la inactivación sustancialmente irreversible se produce dentro de los 5 minutos de incubación a una temperatura de, o aproximadamente de, 50 °C, por ejemplo 48 a 52 °C. Por ejemplo en 1, 2 o 3 minutos de incubación a 50 °C. La ADNasa de la invención se puede inactivar de forma sustancialmente irreversible a temperaturas más bajas o después de periodos de tiempo más cortos pero, de acuerdo con la invención, calentar

durante 5 minutos a aproximadamente 50 °C debe ser suficiente para inactivar la enzima de forma sustancialmente irreversible. Será fácilmente obvio para los expertos que el ajuste de uno de estos dos parámetros se puede compensar mediante el ajuste del otro. Por ejemplo, el aumento de la temperatura de inactivación podría permitir reducir la duración de la incubación. A la inversa, aumentar la duración de la incubación podría permitir utilizar una temperatura de inactivación más baja. Por ejemplo, una ADNasa de acuerdo con la invención podría inactivarse en una incubación de 1 o 2 minutos a una temperatura de 55 °C, en una incubación de 3 minutos a una temperatura de 52 °C, en una incubación de 4 minutos a una temperatura de 51 °C, en una incubación de 10 minutos a una temperatura de 49 °C, o en una incubación de 15 minutos a una temperatura de 48 °C. Claro está, como es también fácilmente obvio para un experto y se muestra en los ejemplos, que cuando la ADNasa de la invención se utiliza en los métodos de la invención, si es práctico se pueden usar duraciones de incubación más largas que 5 minutos y se pueden usar temperaturas de inactivación mayores que aproximadamente 50 °C (por ejemplo la inactivación podría tener lugar a cada una de 50 °C, 55 °C, 65 °C o 94 °C durante cada uno de 15, 30 o 60 minutos; 60 °C durante 15 minutos; o 95 °C durante 10 minutos). Sin embargo, para estar de acuerdo con la invención, una ADNasa debe mostrar inactivación sustancial si se incuba a una temperatura de, o aproximadamente a, 50 °C durante 5 minutos.

Las temperaturas y tiempos de inactivación para una ADNasa deberían evaluarse mediante la incubación de la ADNasa en una solución que imite un tampón típico de PCR o de transcriptasa inversa (por ejemplo Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, MgCl₂ 5 mM). Preferentemente el EDTA debería estar ausente. La ADNasa debería estar presente a aproximadamente entre 0,01 U/μl y 10 U/μl, preferentemente entre 0,05 y 5 U/μl, por ejemplo 0,5 y 1,5 U/μl.

A cualquier temperatura dada la inactivación se puede potenciar en términos de extensión y/o velocidad mediante la presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro (es decir, un agente que inhibe y/o rompe enlaces disulfuro entre dos o más restos de cisteína en una proteína) en el tampón de inactivación. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero sin limitación, DTT, 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP·HCl (tris-(2-carboxietil)fosfina clorhidrato), N-etilmaleimida. El DTT es preferente. De forma alternativa el agente reductor de enlaces disulfuro (por ejemplo DTT) se puede utilizar para reducir la temperatura de inactivación que se necesita para una duración particular de la etapa de inactivación. El experto sería capaz de determinar para sus necesidades las concentraciones apropiadas del agente reductor de enlaces disulfuro que mejorarían la inactivación, pero que no serían perjudiciales para las reacciones aguas abajo. Por ejemplo, el DTT se puede incorporar de forma conveniente en la etapa de inactivación a una concentración de entre 0,05 y 50 mM. El DTT se utiliza de forma rutinaria en las reacciones de transcripción inversa a concentraciones de entre 1 y 10 mM y con frecuencia se utiliza en reacciones de PCR.

Preferentemente, la inactivación de la ADNasa en los métodos de la invención tiene lugar en un tampón de Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM.

El ADN bicatenario lineal y el ADN circular superenrollado son sustratos de la enzima de acuerdo con la invención. La enzima tiene poca, despreciable, o esencialmente no detectable actividad para ADN monocatenario tal como los cebadores de amplificación/transcriptasa inversa. En otras palabras, la ADNasa es sustancialmente específica por ADN bicatenario.

Mediante "sustancialmente específica para ADN bicatenario" se entiende que la ADNasa escinde ADN bicatenario pero tiene poca, despreciable o esencialmente no detectable actividad hacia ADN monocatenario a concentraciones de 0,01 a 0,05 U/μl. Preferentemente, a tales concentraciones no habrá actividad detectable hacia ADN monocatenario. El experto sería fácilmente capaz de idear un experimento para hacer una comparación de la actividad relativa de la ADNasa hacia ADN monocatenario y bicatenario. Anisimova *et al.* (BMC Biochemistry, 2008, 9:14) divulga tal experimento. Brevemente, 2 unidades de Kunitz de una ADNasa bajo prueba se incubaron con ADN de fago M13 (monocatenario) o con ADN de fago lambda (bicatenario) en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5 mM (volumen final de reacción 30 μl) durante una hora y los productos se separaron en un gel de agarosa con bromuro de etidio. La actividad contra ADN monocatenario y/o bicatenario era observable por la posición de las bandas con respecto a los controles no tratados. En el Ejemplo 6 se describe otra estrategia con más detalle. En esta estrategia, la especificidad por ADN bicatenario o monocatenario de una ADNasa se puede probar mediante la medición del aumento de la fluorescencia de oligonucleótidos marcados en el extremo 5' con el fluoróforo FAM (fluoresceína) y en el extremo 3' con TAMRA. TAMRA absorbe (amortigua) la luz que emite FAM cuando las dos marcas están próximas. La escisión del oligonucleótido por la ADNasa da como resultado la separación de FAM de TAMRA, y un aumento de la fluorescencia de FAM que se puede medir en un fluorímetro con excitación de longitud de onda de 485 nm y emisión de longitud de onda de 520 nm. Se puede preparar un sustrato de ADN bicatenario mediante la mezcla del oligonucleótido marcado con un segundo oligonucleótido que sea complementario al oligonucleótido marcado. Claro está que se pueden utilizar de forma semejante otros pares de fluoróforos adecuados.

En el caso de reacciones de transcripción inversa, estas características permiten la inclusión de la ADNasa dentro de una mezcla de reacción de transcripción inversa que comprende a la muestra de ARN, los cebadores, los nucleótidos, la transcriptasa inversa y los tampones (es decir una mezcla de reacción completa) y la rápida degradación de material de contaminación por arrastre y de ADN genómico, por ejemplo a temperatura ambiente. Estas características también permiten la inclusión de la ADNasa en una mezcla completa de reacción de amplificación basada en transcripción inversa de una etapa.

Estas características también permiten la inclusión de la ADNasa en una mezcla de reacción de amplificación que comprende cebadores, nucleótidos, ADN polimerasa y tampones, y la degradación rápida de material de contaminación por arrastre, por ejemplo a temperatura ambiente.

De forma ventajosa, la ADNasa termoinestable de la invención es completamente funcional en una mezcla de reacción de amplificación completa, y es compatible con los reactantes y las condiciones de amplificación *in vitro* convencionales. La enzima debería también ser capaz de eliminar cantidades adecuadas de ADN genómico contaminante y/o la contaminación por arrastre de una mezcla de reacción, normalmente de niveles de fg o pg pero preferentemente de hasta 1 ng. Preferentemente, la ADNasa es capaz de degradar toda la contaminación por arrastre dentro de los 5 minutos a temperatura ambiente, más preferentemente dentro de los 3 minutos, muy preferentemente dentro de los 2 minutos.

Elevar la temperatura de la mezcla de reacción a la temperatura de inactivación de la ADNasa de la invención (50 °C) durante un tiempo corto (5 minutos), inactiva de forma de irreversible la ADNasa de la invención.

En el caso de las reacciones de transcripción inversa, esto puede ser concomitante de forma conveniente con la etapa de transcripción inversa. En el caso de las reacciones de amplificación de ADN (incluyendo PCR de arranque en caliente), después las muestras de ácido nucleico a amplificar y analizar (es decir el ácido nucleico diana) pueden añadirse y comenzar la amplificación. Incluso cuando la temperatura de la mezcla de reacción cae durante el ciclado térmico y después de la amplificación o de la transcripción inversa, las copias de la secuencia diana no se degradarán debido a que la ADNasa se ha inactivado de forma irreversible. Esta es una ventaja particular de la presente invención, que la transcriptasa inversa y/o la ADN polimerasa se pueden incluir en las mezclas de reacción de transcripción inversa y/o de amplificación mientras tienen lugar las etapas de descontaminación y la posterior de inactivación. Esto es resultado de las condiciones suaves que dan como resultado la inactivación de la ADNasa (aproximadamente 50 °C durante 5 minutos), de modo que se elimina una fuente de contaminación adicional potencial.

Preferentemente, la ADNasa tiene mínima actividad nucleasa hacia la hebra de ADN de un dúplex ADN:ARN. Por "mínima" se entiende que la ADNasa tiene una actividad nucleasa hacia la hebra de ADN de un dúplex ADN:ARN que es de menos del 40 % de su actividad hacia un ADN bicatenario. Preferentemente, la ADNasa tendrá una actividad hacia los dúplex de ADN:ARN que es de menos del 30 % o de menos del 20 % de su actividad hacia ADN bicatenario.

Son estas características particulares de las ADNasas preferentes de la invención (es decir, inactivación sustancialmente irreversible rápida, especificidad por doble hebra y, preferentemente, mínima actividad nucleasa de dúplex ADN:ARN) lo que hace a estas ADNasas excepcionalmente adecuadas para la descontaminación de protocolos de amplificación de transcripción inversa de un paso. Esto se debe a que la mezcla de reacción completa se puede descontaminar sin temor a la degradación no deseada de los productos de amplificación o de transcripción inversa, en un único paso y sin necesidad de añadir materiales adicionales. Esto minimiza el riesgo de contaminación (incluyendo el de ADN genómico), sin sacrificar sensibilidad a través de la digestión no deseada del producto inicial de transcripción inversa y/o del producto de amplificación.

La propia enzima ADNasa utilizada en los métodos anteriores constituye un aspecto adicional de la invención. Por lo tanto, este aspecto de la invención proporciona una ADNasa que se inactiva de forma sustancialmente irreversible mediante el calentamiento a una temperatura de 50 °C durante 5 minutos, y que es sustancialmente específica para ADN bicatenario. Preferentemente, estas características de inactivación se logran en ausencia de EDTA.

Aunque está claro que cualquier ADNasa termoinestable que tenga las características descritas anteriormente puede ser adecuada para su uso en los métodos de acuerdo con la invención, las ADNasas modificadas obtenidas a partir de la ADNasa de *Pandalus borealis*, o una ADNasa semejante de otro organismo, preferentemente marino, en la que un resto prolina particular se ha modificado, suprimido o sustituido, forman otro aspecto de la presente invención. El organismo puede ser un procariota o un eucariota. Por "procariota" se entiende cualquier organismo que carece de un núcleo celular, es decir cualquier organismo de los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Preferentemente el organismo es una bacteria. Más preferentemente el organismo es un eucariota, por ejemplo un organismo clasificado en los reinos taxonómicos de *Animalia*, *Plantae*, *Fungi* o *Protista*, por ejemplo, un organismo en el filo/división *Acanthocephala*, *Acoelomorpha*, *Annelida*, *Arthropoda*, *Brachiopoda*, *Bryozoa*, *Chaetognatha*, *Chordata*, *Cnidaria*, *Ctenophora*, *Cycliophora*, *Echinodermata*, *Echiura*, *Entoprocta*, *Gastrotricha*, *Gnathostomulida*, *Hemichordata*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Micrognathozoa*, *Mollusca*, *Nematoda*, *Nematomorpha*, *Nemertea*, *Onychophora*, *Orthonectida*, *Phoronida*, *Placozoa*, *Platyhelminthes*, *Porifera*, *Priapulida*, *Rhombzoa*, *Rotifera*, *Sipuncula*, *Xenoturbellida*, *Anthocerotophyta*, *Bryophyta*, *Marchantiophyta*, *Lycopodiophyta*, *Pteridophyta*, *Pteridospermatophyta*, *Coniferophyta*, *Cycadophyta*, *Ginkgophyta*, *Gnetophyta*, *Anthofita* (o *Magnoliophyta*), *Chytridiomycota*, *Deuteromycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* o *Basidiomycota*. Son de destacar los organismos del reino *Animalia*, por ejemplo, invertebrados y vertebrados. Más preferentemente el organismo se selecciona de aquellos en el filo *Arthropoda*, por ejemplo, un organismo en los subfilos *Crustacea*, *Hexapoda*, *Chelicerata* o *Myriapoda*, por ejemplo, un organismo en las clases *Crustacea* o *Branchiopoda*, *Remipedia*, *Cephalocarida*, *Maxillopoda*, *Ostracoda* o *Malacostraca*, preferentemente *Malacostraca* y más preferentemente un organismo en el orden *Decapoda*. El organismo se puede clasificar en la familia *Pandalidae*, por ejemplo, en los

géneros *Anachlorocurtis*, *Atlantopandalus*, *Austropandalus*, *Calipandalus*, *Chelonika*, *Chlorocurtis*, *Chlorotocella*, *Chlorotocus*, *Dichelopandalus*, *Dorodotes*, *Heterocarpus*, *Miopandalus*, *Notopandalus*, *Pandalina*, *Pandalopsis*, *Pandalus*, *Pantomus*, *Peripandalus*, *Plesionika*, *Proclestes*, *Pseudopandalus* o *Stylopandalus*; la familia *Lithodidae*, por ejemplo, en los géneros *Cryptolithodes*, *Glyptolithodes*, *Lithodes*, *Lopholithodes*, *Neolithodes*, *Paralithodes*, *Paralomis*, *Phyllolithodes* o *Rhinolithode*; o la familia *Penaeidae*, por ejemplo, en los géneros: *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus*, *Litopenaeus* o *Marsupenaeus*. El organismo es preferentemente un organismo que ha evolucionado para habitar ambientes fríos, por ejemplo, ambientes marinos o acuáticos fríos. El organismo preferentemente se seleccionará de, por ejemplo, *Paralithodes camtschaticus* (cangrejo rojo gigante), *Marsupenaeus japonicus* (camarón kuruma) o *Penaeus japonicus*. En otras realizaciones la ADNasa es de una especie de organismo que no es un procariota, por ejemplo, no es una bacteria, por ejemplo, no es una bacteria psicotrófica.

También están incluidos dentro del alcance de la presente invención, fragmentos enzimáticamente activos de estas ADNasas modificadas.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una ADNasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, teniendo dicha ADNasa la secuencia de SEC ID N°: 1 o una secuencia que es al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, 80 %, 90 % o 95 %, por ejemplo, al menos el 98 %, idéntica a la misma, pero en la que el resto prolina en la posición 237 de SEC ID N°: 1, o la prolina equivalente en otras secuencias, se modificó, suprimió o sustituyó, habiéndose dicha ADNasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma inactivado de forma sustancialmente irreversible mediante el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 50 °C durante 5 minutos, y la que es sustancialmente específica por ADN bicatenario.

SEC ID N°: 1 es la secuencia de aminoácidos de la porción traducida del ADNc para la ADNasa de *Pandalus borealis*. La secuencia de ADNc se muestra en SEC ID N°: 2. SEC ID N°: 1 comprende una secuencia péptido señal de MIGRTTFIALFVKVLTWSFTKG (SEC ID N°: 9). La forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis* se muestra en SEC ID N°: 5 (es decir, la secuencia de SEC ID N°: 1 sin el péptido señal (SEC ID N°: 9)). Por lo tanto, la prolina en el resto 237 de SEC ID N°: 1 es la misma posición que la prolina en el resto 214 de SEC ID N°: 5.

Por lo tanto, la invención también proporciona una ADNasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, teniendo dicha ADNasa la secuencia de SEC ID N°: 5 o una secuencia que es al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, 80 %, 90 % o 95 %, por ejemplo, al menos el 98 %, idéntica a la misma, pero en la que el resto prolina en la posición 214 SEC ID N°: 5, o la prolina equivalente en otras secuencias, se modificó, suprimió o sustituyó, habiéndose dicha ADNasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma inactivado de forma sustancialmente irreversible mediante el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 50 °C durante 5 minutos, y la que es sustancialmente específica por ADN bicatenario.

Los fragmentos enzimáticamente activos y variantes de SEC ID N°: 1 presentan al menos el 70 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 95 % y muy preferentemente al menos el 99 % de la función enzimática de la enzima madura de SEC ID N°: 5 (es decir, la capacidad de hidrolizar un enlace fosfodiéster en un esqueleto de ADN sin especificidad de secuencia de nucleótidos). Como se discute en otra parte, la actividad de una ADNasa se puede evaluar fácilmente utilizando técnicas de rutina.

El porcentaje de identidad de secuencia de acuerdo con la invención, se puede calcular utilizando cualquiera de los algoritmos ampliamente disponibles (por ejemplo, utilizando el programa de alineamiento de secuencias múltiples Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>), usando parámetros predeterminados (penalización de apertura de hueco de ADN = 15,0; penalización de extensión de hueco de ADN = 6,66; Matriz de ADN = Identidad; penalización de apertura de hueco de proteína = 10,0; penalización de extensión de hueco de proteína = 0,2; Matriz de proteína = Gonnet; *ENDGAP* proteína/ADN = -1; *GAPDIST* proteína/ADN = 4).

Los “restos de prolina equivalentes en otras secuencias” que no sean SEC ID N°: 1 o 5 se pueden identificar fácilmente utilizando técnicas de alineamiento de secuencias convencionales tales como Clustal W2 para producir alineamientos tales como el representado en la Fig. 11.

Preferentemente la ADNasa de la invención o fragmento de la misma tendrá la secuencia de una ADNasa obtenible a partir de especies clasificadas en cualquiera de los agrupamientos taxonómicos mencionados anteriormente, por ejemplo, a partir del filo *Arthropoda* o de los subfilos *Crustacea*, *Hexpoda*, *Chelicerata* y *Myriapoda*, por ejemplo, *Pandalus borealis*, *Paralithodes camtschaticus* (cangrejo rojo gigante), *Marsupenaeus japonicus* (camarón kuruma) o *Penaeus japonicus*, pero en la que el resto prolina equivalente a la prolina en la posición 237 de SEC ID N°: 1 se modificó, suprimió o sustituyó. Es preferente la ADNasa de *Pandalus borealis*, en la que el resto de prolina equivalente a la prolina de la posición 237 de SEC ID N°: 1 se modificó, suprimió o sustituyó.

En una realización muy preferente la ADNasa de la invención tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 o 7.

Por “substitución” de la prolina (por ejemplo, en el resto 237 de SEC ID N°: 1/resto 214 de SEC ID N°: 5), se entiende que el resto prolina se reemplaza por cualquier otro aminoácido de origen natural, normalmente codificado

de forma genética, por cualquier aminoácido de origen natural, normalmente codificado genéticamente, o por un análogo de aminoácido. Preferentemente, la prolina se reemplaza por alanina, glicina, serina, o cisteína.

Por "modificación" de la prolina se entiende que el resto prolina tiene sus propiedades estereoquímicas usuales alteradas, por ejemplo por el reemplazo de su cadena lateral con un grupo distinto, modificando la composición de la propia cadena lateral o reemplazando el hidrógeno de la cadena lateral opuesta con un grupo lateral distinto.

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las ADNasa de la invención. Se divulgan en SEC ID N°: 4 y 8 secuencias de nucleótidos que corresponde a la secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 3 y 7. La degeneración del código genético significa que SEC ID N°: 4 y 8 son solamente dos de las muchas posibles secuencias de nucleótidos.

La invención también proporciona el uso de las ADNasa particulares descritas anteriormente, como un agente descontaminante en métodos de amplificación de un ácido nucleico. El uso de las ADNasa particulares descritas anteriormente en los métodos de descontaminación descritos en el presente documento, representa una realización particularmente preferente de la invención.

Representa un aspecto adicional de la presente invención un método para el aislamiento y purificación de una ADNasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, según se describe anteriormente. Por lo tanto, en este aspecto la invención proporciona tal método, comprendiendo dicho método expresar dicha ADNasa o fragmento de la misma en una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, *Pichia pastoris*; *E. coli*; *S. cerevisiae*, células de insecto infectadas con baculovirus), y separar posteriormente la ADNasa a partir de dichas células hospedadoras y/o del medio en el que se cultivaron dichas células. Se puede lograr la expresión de dicha ADNasa o fragmento de la misma, incorporando en una célula hospedadora adecuada un vector de expresión que codifica dicha ADNasa o fragmento de la misma, por ejemplo, un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 3 y 7, por ejemplo la molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos de SEC ID N°: 4 u 8. La invención abarca a las células hospedadoras que comprenden estos casetes de expresión y moléculas de ácido nucleico.

La enzima ADNasa se puede separar, o aislar, a partir de células hospedadoras/medio de cultivo utilizando cualquiera de las técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica y descritas ampliamente en la bibliografía, o cualquier combinación de las mismas. Tales técnicas pueden incluir, por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, diálisis, diversas técnicas cromatográficas, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, electroforesis, centrifugación, etc.

Asimismo, también se puede preparar un extracto de células hospedadoras utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, homogenización, congelación-descongelación, etc. y a partir de este extracto la ADNasa de la invención se puede purificar.

Se ha descubierto que puede utilizarse fácilmente para aislar la enzima un protocolo de purificación basado en una combinación de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, por ejemplo en una columna de sefarosa, por ejemplo una columna de sefarosa Red (Pharmacia Biotech, Suecia) o una columna de sefarosa Blue (GE Healthcare).

Más particularmente, el extracto se puede someter a cromatografía de intercambio iónico y la proteína eluirse con un gradiente de NaCl. Las fracciones que conteniendo actividad ADNasa se pueden dializar y después aplicar a una columna de afinidad, antes de la elución final con NaCl.

La presente invención también proporciona kits que comprenden al menos una ADNasa de acuerdo con la invención. Los kits también pueden contener algunos o todos los reactivos, tampones, enzimas, etc., necesarios para llevar a cabo reacciones de amplificación y/o de transcripción inversa. Más particularmente, los kits pueden contener nucleótidos trifosfato (incluyendo dNTPaS para SDA), cebadores de oligonucleótidos, transcriptasas inversas, preferentemente las capaces de funcionar a aproximadamente 50 °C, ADN polimerasas, preferentemente una polimerasa termoestable tal como la polimerasa *Taq* o la polimerasa *Bst* (y versiones de arranque en caliente de las mismas) o, en el caso de LAR, una ADN ligasa (preferentemente una ADN ligasa termoestable tal como Ampligase[®], o la divulgada en el documento US6280998 que está aislada de *Pyrococcus furiosus*) o una enzima de restricción (preferentemente una enzima de restricción termoestable tal como *BsoB1*). Se puede proporcionar la ADNasa en un compartimento junto con una transcriptasa inversa, una ADN polimerasa, una polimerasa de desplazamiento de hebra o LCR ligasa.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden una ADNasa de la invención y uno o más de los reactivos necesarios para llevar a cabo reacciones y métodos de amplificación y/o transcripción inversa de ácidos nucleicos, por ejemplo, los componentes descritos anteriormente. Normalmente, tales composiciones serán acuosas y estarán tamponadas con un tampón convencional, tal como Tris, HEPES, etc.

Está claro que los métodos de transcripción inversa son ahora convencionales en la técnica, y se pueden efectuar utilizando cualquiera de los reactivos y técnicas conocidos o convencionales.

En un protocolo de transcripción inversa típico, la etapa de descontaminación puede simplemente implicar la incubación de la mezcla de reacción de la transcripción inversa conteniendo la ADNasa durante un período corto de tiempo, por ejemplo, de 1 a 30 minutos a temperatura ambiente, convenientemente de 2 a 15 minutos. El tiempo de esta incubación no es crítico y puede variar dependiendo de la ADNasa y concentración exactas utilizadas, y de los otros componentes del sistema de reacción. La temperatura puede ser cualquier temperatura a la que la enzima está activa, es decir, por debajo de la temperatura de inactivación (por ejemplo, 37 °C), pero es conveniente la temperatura ambiente.

Tal mezcla de reacción puede, como se menciona anteriormente, contener todos reactantes necesarios para la reacción de transcripción inversa.

Por ejemplo, una mezcla de transcripción inversa representativa típica puede incluir:

Componente	Concentración Final
dATP	50-200 µM
dCTP	50-200 µM
dGTP	50-200 µM
dTTP	50-200 µM
Cebador	0,05-0,2 µM
Transcriptasa inversa VMA	10-200 Unidades
ADNasa bc de SEC ID N°: 7	0,1-2 Unidades
Tampón de transcripción inversa	1X
Agua destilada estéril	hasta 50-100 µl finales
Molde experimental	50 pg-100 ng
Mezcla total	25-50 µl

En el ejemplo representativo anterior, se puede utilizar cualquier combinación de volúmenes de agua destilada estéril y de molde experimental, en tanto el volumen total de la reacción (incluyendo las soluciones de tampón, dNTP, cebadores, enzimas y MgCl₂) sea igual a 50-100 µl. Sin embargo, se pueden utilizar volúmenes finales alternativos de acuerdo con la elección, para lograr, por ejemplo, concentraciones de reactantes finales deseadas semejantes, u otras. Se puede utilizar cualquier tampón de transcripción inversa conveniente o disponible de forma comercial. Un tampón de transcripción inversa 5X adecuado puede ser Tris-HCl 250 mM (pH 8,5 a 25 °C), MgCl₂ 40 mM, KCl 150 mM, DTT 5 mM. Se puede adquirir un tampón de transcripción inversa de Fermentas.

La cantidad de ADNasa necesaria podría variar dependiendo del nivel de contaminación potencial. Con una etapa corta de incubación (0-15 minutos a temperatura ambiente), 2,0 unidades/50 µl de mezcla de reacción, es en general más que suficiente. Es adecuado 0,1 a 2,0 unidades/50 µl de mezcla de reacción y es preferente una actividad de aproximadamente 0,5 unidades /50 µl de mezcla de reacción por ejemplo, 0,2 a 1,0 unidades/50 µl de mezcla de reacción). A una concentración de 2,0 unidades/50 µl de mezcla de reacción se observa algo de actividad ADNasa sc y, por lo tanto, son preferentes las actividades enumeradas anteriormente. Una unidad de enzima se define como la cantidad que en un ensayo de Kunitz, o el ensayo modificado de Kunitz de Yamamoto (ambos citados anteriormente), aumenta la absorción a 260 nm en 0,001 por minuto. Después de la incubación, la ADNasa se inactiva mediante el calentamiento de la mezcla de reacción. De forma conveniente esto se puede lograr por calentamiento en la etapa de transcripción inversa, por ejemplo alrededor de 50 °C durante 30 minutos.

De forma conveniente, el método de amplificación que comprende la etapa de descontaminación que utiliza una ADNasa de la invención implicará o estará basado en la PCR. Los métodos de PCR son convencionales en la técnica y se pueden efectuar utilizando cualquiera de los reactivos y técnicas conocidos o convencionales.

En un protocolo de reacción de PCR típico, la etapa de descontaminación simplemente puede implicar la incubación durante un periodo corto de tiempo de la mezcla de reacción de amplificación conteniendo la ADNasa, por ejemplo de 1 a 10 minutos a temperatura ambiente, de forma conveniente de 2 a 5 minutos. El tiempo de esta incubación no es crítico y puede variar dependiendo de la ADNasa y concentración exactas utilizadas, y de los otros componentes del sistema de reacción. La temperatura puede ser cualquier temperatura a la que la enzima está activa, es decir por debajo de la temperatura de inactivación (por ejemplo 37 °C), pero es conveniente la temperatura ambiente.

Tal mezcla de reacción puede, como se menciona anteriormente, contener todos lo reactantes necesarios para la reacción de amplificación aparte del molde, es decir el ácido nucleico diana a amplificar.

Una mezcla de reacción de amplificación de PCR representativa típica puede incluir, por ejemplo:

Componente	Concentración final
dATP	50-200 µM

Componente	Concentración final
dCTP	50-200 μ M
dGTP	50-200 μ M
dTTP	50-200 μ M
Cebador 1	0,05-0,2 μ M
Cebador 2	0,05-0,2 μ M
ADN polimerasa	1-2,5 Unidades
ADNasa bc de SEC ID N°: 7	0,1-2 Unidades
MgCl ₂	1,5-3,0 μ M
Tampón de PCR	1X
Agua destilada estéril	Hasta 50-100 μ l finales
Molde experimental (a añadir después de la inactivación de la ADNasa)	50 pg-100 ng
Mezcla total	25-50 μ l

En el ejemplo representativo anterior, se puede utilizar cualquier combinación de volúmenes de agua destilada estéril y de molde experimental, en tanto el volumen total de la reacción (incluyendo soluciones de tampón, los dNTP, cebadores, enzimas y MgCl₂) sea igual a 25-50 μ l. Sin embargo, se pueden utilizar volúmenes finales alternativos de acuerdo con la elección, para lograr, por ejemplo, las concentraciones finales deseadas de los reactantes semejantes, u otras. Se puede utilizar cualquier tampón de PCR conveniente o disponible de forma comercial.

Después de la descontaminación, la ADNasa se inactiva mediante calentamiento de la mezcla de reacción. De forma conveniente, esto se puede lograr mediante calentamiento en el primer ciclo de PCR.

La elección de la temperatura, tiempo a esa temperatura, y la duración del tiempo entre temperaturas para cada etapa en el ciclo, influyen la realización óptima del procedimiento de PCR. Un perfil típico de ciclado para la utilización de la ADNasa para degradar ADN bc contaminante antes de la amplificación por PCR de ácidos nucleicos diana añadidos recientemente es como sigue: (a) 0 a 10 minutos de incubación con ADNasa a temperatura ambiente; (b) 2 minutos de inactivación de la ADNasa a 94 °C; (c) adición del molde; 1 minuto de fusión del ADN a 94 °C; (d) 15 segundos de hibridación del cebador a 50-65 °C; (e) 30 segundos de extensión del cebador a 72 °C; (f) 10 segundos de fusión del ADN a 94 °C; y las etapas (d)-(f) se repiten tantas veces como sea necesario para obtener el nivel de amplificación deseado.

Como se menciona previamente, la ADNasa de la invención es especialmente adecuada para una reacción de amplificación de transcripción inversa de una etapa, por ejemplo transcripción inversa PCR. Tales protocolos están bien establecidos en la técnica pero, por amplitud, una mezcla de transcripción inversa PCR representativa típica podría incluir, por ejemplo:

Componente	Concentración final
dATP	50-200 μ M
dCTP	50-200 μ M
dGTP	50-200 μ M
dTTP	50-200 μ M
Cebador 1	0,05-0,2 μ M
Cebador 2	0,05-0,2 μ M
Transcriptasa inversa VAM	10-200 Unidades
ADN polimerasa	1-2,5 Unidades
ADNasa bc de SEC ID N°: 7	0,1-2 Unidades
MgCl ₂	3,0-6,0 mM
Tampón de PCR	1X
Agua destilada estéril	hasta 25-50 μ l finales
Molde de ARN experimental	50 pg-100 ng
Mezcla total	25-50 μ l

La discusión anterior en relación a los volúmenes y tampones en las reacciones de transcripción inversa y PCR es aplicable aquí. Después de la descontaminación, la reacción de transcripción inversa se realiza a una temperatura a la que la ADNasa se inactiva (por ejemplo, a 50 °C durante una hora). Durante esta etapa la ADNasa está inactiva. Esto significa que el producto de ADNc no se degradará según se produce, y tampoco hay degradación de este producto cuando la reacción de PCR comienza. Después de la reacción de transcripción inversa, la reacción de PCR se realiza sin la adición adicional a las mezclas de reacción mediante la exposición de los recipientes de reacción a un perfil de ciclado tal como al perfil descrito anteriormente.

La invención se describirá ahora por medio de ejemplos no limitantes, con referencia a las siguientes figuras en las que:

La Figura 1 muestra fotografías de varios geles de agarosa que muestran la actividad de la ADNasa de SEC ID N°: 7 y de la ADNasa de *Pandalus borealis* de tipo silvestre (SEC ID N°: 6) que se han inactivado en presencia o ausencia de DTT a 50, 55, 65 o 94 °C durante 15, 30 o 60 minutos, contra ADN plasmídico a 37 °C durante 3 horas.

La Figura 2 muestra el curso temporal de la inactivación de la ADNasa de SEC ID N°: 7 a 55 °C en presencia de DTT.

La Figura 3 muestra el curso temporal de la inactivación de la ADNasa de SEC ID N°: 7 a 50 °C en presencia de DTT.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la forma madura del mutante P214A de la ADNasa de *Pandalus borealis* de la invención (SEC ID N°: 7).

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos codificante del mutante P214A de la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis* (SEC ID N°: 8).

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del mutante P237A de la ADNasa de *Pandalus borealis* de la invención (SEC ID N°: 3 y 4). Esta secuencia de aminoácidos incluye el péptido señal MIGRTTFIALFVKVLTWSFTKG (SEC ID N°: 9).

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis* (SEC ID N°: 5).

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos codificante de la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis* (SEC ID N°: 6).

La Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc y la secuencia de aminoácidos traducida de la ADNasa de *Pandalus borealis* (SEC ID N°: 1 y 2). Esta secuencia de aminoácidos incluye el péptido señal MIGRTTFIALFVKVLTWSFTKG (SEC ID N°: 9).

La Figura 10 muestra el efecto de la ADNasa de *Pandalus borealis* de tipo silvestre y del mutante P214A sobre la eficacia de la RT (sigla del inglés *reverse transcription*)-PCR de una etapa.

La Figura 11 muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de la ADNasa (SEC ID N°: 15) del cangrejo rojo gigante (*Paralithodes camtschaticus*) y la ADNasa de *Pandalus borealis* (SEC ID N°: 5). 65,7 % de identidad en solapamiento de 379 residuos; puntuación: 1384,0; frecuencia de hueco: 0,0 %.

La Figura 12 muestra el efecto de las concentraciones crecientes del mutante P214A en un protocolo de PCR cuantitativa.

La Figura 13 muestra una comparación de la termoinestabilidad de la ADNasa I y del mutante P214A, a través de la medición de los efectos inhibitorios de las enzimas tratadas con calor sobre un protocolo de PCR cuantitativa.

La Figura 14 muestra el grado de eliminación de ADN adicionado de una mezcla de reacción de PCR cuantitativa con cantidades crecientes del mutante P214A.

La Figura 15 muestra el efecto de concentraciones crecientes del mutante P214A sobre una reacción de RT-PCR de una etapa.

La Figura 16 muestra el efecto del mutante P214A sobre controles de PCRC sin molde.

y en la que

SEC ID N°: 1 es la secuencia de aminoácidos de la porción traducida de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 2 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 3 es la secuencia de aminoácidos del mutante P237A de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 4 es la secuencia de nucleótidos que codifica el mutante P237A de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 5 es la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 6 es la secuencia de nucleótidos que codifica la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos del mutante P214A de la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 8 es la secuencia de nucleótidos que codifica al mutante P214A de la forma madura de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal de la ADNasa de *Pandalus borealis*.

SEC ID N°: 10 es un oligonucleótido marcado en el 5' con FAM y en el 3' con TAMRA, para la medición de la actividad ADNasa.

SEC ID N°: 11 es la secuencia complementaria de SEC ID N°: 10.

SEC ID N°: 12 es un cebador directo para la amplificación de una sección del gen ARNr23S de *E.coli*.

SEC ID N°: 13 es un cebador inverso para la amplificación de una sección del gen ARNr23S de *E.coli*.

SEC ID N°: 14 es una sonda de oligonucleótido marcada en el 5' con FAM y en el 3' con BHQ, complementaria a una sección del gen ARNr23S de *E.coli* entre regiones complementarias a SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

SEC ID N°: 15 es la secuencia de aminoácidos de la ADNasa del cangrejo rojo gigante (*Paralithodes camtschaticus*).

Texto libre del listado de secuencias

SEC ID N°: 10

<223> sonda de oligonucleótido marcada en el 5' con FAM y en el 3' con TAMRA para la medición de la actividad ADNasa.

SEC ID N°: 11

<223> secuencia complementaria de SEC ID N°: 10.

SEC ID N°: 12

<223> cebador directo para la amplificación de una sección del gen ARNr23S de *E.coli*.

SEC ID N°: 13

<223> cebador inverso para la amplificación de una sección del gen ARNr23S de *E.coli*.

SEC ID N°: 14

<223> sonda de oligonucleótido marcada en el 5' con FAM y en el 3' con BHQ, complementaria a una sección del gen ARNr23S de *E.coli* entre las regiones complementarias a SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

EJEMPLO 1- Medición de actividad ADNasa

Ensayo de Kunitz

La actividad ADNasa se puede ensayar de acuerdo con el procedimiento de Kunitz (Kunitz, M., 1950, Crystalline Deoxyribonuclease, II, Digestion of Thymus Nucleic Acid. The Kinetics of Reaction. J. Gen. Physiol., 33, 363-377). Se añaden 10 µl de preparación de enzima a 50 µg de ADN de timo de ternera en acetato de sodio 100 mM, pH 5,0, MgCl₂ 5 mM, en un volumen final de 1 ml. La mezcla se incuba a 25 °C y el aumento de la absorción se mide a 260 nm. 1 U = aumento de DO₂₆₀ de 0,001 x min⁻¹.

El ensayo de Kunitz modificado de Yamamoto

El ensayo de Kunitz modificado, un ensayo por punto final, que describe Yamamoto (Yamamoto, M. 1971. Purification and some properties of an acid deoxyribonuclease from testes of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Biochim Biophys Acta, 228, 95-104), es una versión más sensible del ensayo de Kunitz y se considera que es más adecuada para la medición de la actividad ADNasa residual después de la inactivación. Se añaden 10 µl de enzima a 200 µg de ADN de timo de ternera en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, en un volumen final de 1 ml. La mezcla se incuba a 37 °C durante 20 minutos. Después se añaden 0,5 ml de HClO₄ al 12 % helado, se mezcla minuciosamente, y se deja en hielo durante 20 minutos. Los tubos se centrifugan a velocidad máxima en una centrifuga Eppendorf durante 10 minutos. Se determina la absorción a 260 nm, a partir de la cual se calculan las Unidades. 1 U = aumento de DO₂₆₀ en 0,001 x min⁻¹.

EJEMPLO 2 - Mutación de la ADNasa de *Pandalus borealis*

Se mutó la ADNasa de *Pandalus borealis* (SEC ID N°: 5) en el resto 214 (que corresponde al resto 237 en SEC ID N°: 1) utilizando el kit de mutagénesis Quick-change™ de Invitrogen y las instrucciones de los fabricantes. La prolina es el resto de tipo silvestre y la alanina fue el resto de reemplazo. Las Figuras 4 a 9 muestran las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos del tipo silvestre y de las versiones mutadas de la ADNasa de *Pandalus borealis*. Los mutantes se secuenciaron y se encontró que eran correctos, y se transformaron en *Pichia pastoris*. Se obtuvo un transformante que demostró una expresión buena, semejante a la de tipo silvestre. Las pruebas iniciales de inactivación en el mutante P214A demostraron que se inactiva de forma más fácil a 55 °C que la ADNasa de tipo silvestre.

Después, el clon recombinante de *Pichia pastoris* conteniendo el casete de expresión de la ADNasa mutante P214A se expresó en un fermentador de un litro. La fermentación se hizo como se describe en *Pichia fermentation process guidelines*, de Invitrogen. El fermentado (aproximadamente 1 l) se centrifugó a 4500xg durante 15 minutos para eliminar las células, y se vertió el sobrenadante en una nueva botella. Se ajustó el pH a 8 mediante la adición de NaOH 0,5 M y después se centrifugó a 4500xg durante 15 minutos para eliminar sales precipitadas. Finalmente, se filtró el nuevo sobrenadante a través de un filtro Whatman GF/F.

La proteína ADNasa P214A se purificó de forma inicial utilizando cromatografía de intercambio aniónico. El sobrenadante filtrado y con el pH ajustado (1150 ml) se aplicó a una columna Q-Sefarosa FF (2,6/10) equilibrada con Tris/HCl 25 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 0.25 M (Tampón A). Después se lavó la columna con 19 volúmenes de columna de Tampón A y después la proteína P214A se eluyó con tampón Tris/HCl 25 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 0,5 M. Se recogieron fracciones de 10 ml. El caudal utilizado fue de 10 ml/min. Las fracciones conteniendo la proteína P214A se seleccionaron mediante la medición de la actividad de acuerdo con el método de Kunitz descrito en el Ejemplo 1.

Las fracciones seleccionadas se agruparon y se dializaron en Tris/HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM (Tampón B) a 4 °C. El volumen de la muestra dializada se ajustó a 200 ml utilizando el mismo tampón, y después se aplicó a una columna de Sefarosa Blue FF (5,0/10) equilibrada con Tampón B. Se lavó la columna con 2 volúmenes de columna de Tampón B y se eluyó la proteína ADNasa P214A utilizando Tampón B + NaCl 0,25 M, y se recogieron fracciones de 10 ml. El caudal utilizado fue de 10 ml/min. Finalmente, las fracciones conteniendo P214A se seleccionaron mediante la medición de la actividad según se describe anteriormente, se agruparon y se concentraron.

EJEMPLO 3 - Determinación de la actividad residual después de la inactivación a distintas temperaturas

Para determinar si el mutante P214A se inactiva de forma completa mediante calor, se evaluó la integridad de un producto de PCR en presencia del mutante P214A inactivado por calor o de la enzima de tipo silvestre.

Se añadió la enzima (P214A 0,8 U, o ts 1,5 U) a los tubos de PCR conteniendo un volumen total de 20 µl en tampón Tris/HCl 25 mM, pH 8, MgCl₂ 5 mM, ± DTT 1 mM. Las enzimas se inactivaron por calor durante 15, 30 y 60 minutos a diversas temperaturas y posteriormente los tubos se colocaron sobre hielo. Se añadieron 0,5 µg de un producto de PCR purificado de ~500 pb y las reacciones se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Finalmente, las reacciones se analizaron utilizando electroforesis en gel de agarosa. Un control negativo (sin enzima) y un control positivo (enzima diluida 100 x añadida después de la etapa de inactivación por calor) se trataron del mismo modo que las reacciones anteriores.

La Figura 1 resume los experimentos de inactivación por calor del mutante P214A en comparación con la enzima de tipo silvestre, a 50 °C, 55 °C, 65 °C y 94 °C. El control sin enzima (-) muestra el producto de PCR intacto, mientras que el control positivo (+), enzima diluida 100 veces no inactivada por calor, ilustra el efecto del 1 % de actividad residual.

A partir de los experimentos de control, la no degradación visible del producto de PCR indica menos del 0,01 % de actividad residual (resultados no mostrados), que es el límite de detección cuando se utiliza ~1 U de enzima en el ensayo. A 50 °C y 55 °C solamente el mutante P214A se inactiva por calor de forma completa, demostrando el efecto de la sustitución P214A. La adición de DTT (1 mM en este experimento) es necesaria para la inactivación completa de ambas enzimas. Solo cuando se incubó durante 60 min a 94 °C se observa la inactivación por calor completa observada en ausencia de DTT.

EJEMPLO 4 - Curso temporal de la inactivación de P214A a 50 °C y a 55 °C

Si para descontaminar una mezcla de reacción de transcriptasa inversa completa se utiliza una ADNasa, es importante que esta se inactive de forma temprana en la etapa de transcriptasa inversa. Si la nucleasa no se inactiva de forma inmediata podría comenzar a escindir el ADNc y tener un efecto perjudicial sobre los productos de transcripción inversa. Esto es especialmente importante si la transcripción inversa es parte de un ensayo cuantitativo para medir la cantidad de ARN en una muestra. Por lo tanto, se probó la inactivación de la ADNasa mutante P214A a 50 °C y a 55 °C en puntos temporales cortos.

Se diluyó P214A, 12,5-125 U, en un buffer de RT típico (Tris/HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM) en un volumen total de 25 µl. Las mezclas se incubaron a 50 y 55 °C en una máquina de PCR durante 0-5 minutos. Después, la actividad restante se midió utilizando el ensayo modificado de Kunitz, como se describe en el Ejemplo 1.

Como se puede observar en las Figuras 2 y 3, el mutante P214A se puede inactivar de forma completa en un minuto a 55 °C e inactivar de forma casi completa en un minuto a 50 °C.

EJEMPLO 5 - Efecto de la ADNasa de tipo silvestre y de *Pandalus borealis*, y del mutante P214A, sobre la eficacia de la RT-PCR de una etapa

Se realizaron reacciones de amplificación RTc-PCR de una etapa utilizando Brilliant RTC-PCR Master Mix Kit 1-Step (Stratagene), y el termociclado y la detección en un Smart Cycler II (Cepheid).

La mezcla de reacción (25 µl) contenía 12,5 µl de mezcla maestra de RTC-PCR 2X, mezcla de cebador/sonda 20x 1,25 µl (GAPDH HS99999905_m1, Applied Biosystems), transcriptasa inversa Stratascript 0,1 µl, enzima ADNasa 1 µl. Como molde se utilizó ARN total de ser humano de referencia de PCRC de Stratagene (Stratagene). Cada mezcla de reacción se preincubó a 30 °C durante 15 minutos. La transcripción inversa PCR de una etapa se realizó a 50 °C durante 30 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min.

Como se muestra en la Figura 10, se observó poco a ningún efecto sobre la eficacia de la RT-PCR en las muestras que contenían el mutante P214A. Por otro lado, la nucleasa de tipo silvestre afecta de forma grave la eficacia de la RT-PCR.

EJEMPLO 6 - Análisis de las especificidades de ADN bc/mc para P214A

Se probó la especificidad por ADN bicatenario o monocatenario para P214A, mediante la medición de la fluorescencia de oligonucleótidos marcados con el fluoróforo FAM (fluoresceína) en el extremo 5' y con TAMRA en el extremo 3'. La escisión del oligonucleótido mediante la nucleasa resultaría en un aumento de la fluorescencia de FAM que se mide en un fluorímetro con excitación de longitud de onda de 485 nm y emisión de longitud de onda de

520 nm. Se preparó un sustrato de ADN bicatenario mediante la mezcla del oligonucleótido marcado con un segundo oligonucleótido que era complementario al oligonucleótido marcado.

Se añadieron 37 unidades del mutante P214A a la mezcla de reacción que contenía Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM y oligonucleótido marcado (ADNsub) 0,2 µM (volumen total 100 µl). La mezcla se incubó a 25 °C en una placa de microtitulación de pocillos blancos para fluoroscopia.

De forma similar, se añadió el oligonucleótido complementario compADNsub a 0,2 µM a una mezcla de reacción como anteriormente, para formar un sustrato de ADN bicatenario. Entonces se añadieron 0,01 unidades de mutante P214A a la mezcla de reacción.

Se midió la fluorescencia a lo largo del tiempo en un instrumento Victor3 y se calculó la actividad como el aumento inicial de la fluorescencia por minuto, corregido para el aumento de la fluorescencia sin nucleasa (reacción en blanco), y se expresó como (unidades de fluorescencia/minuto)/unidades de Kunitz.

Para el sustrato de ADN bicatenario el resultado fue de 211.922 (unidades de fluorescencia/minuto)/unidades de Kunitz, y para el sustrato de ADN monocatenario el resultado fue de 10,4 (unidades de fluorescencia/minuto)/unidades de Kunitz. Por consiguiente, el sustrato de ADN bicatenario se degrada a una tasa 20.366 veces más rápida que el ADN monocatenario. Oligonucleótidos:

ADNsub: 5'-FAM-CGCCATCGGAGGTTT-TAMRA-3' [SEC ID N°: 10]
compADNsub: 5'-GAACCTCCGATGGCG-3' [SEC ID N°:11]

EJEMPLO 7 - Descontaminación de la PCRc utilizando el mutante P214A

Materiales y métodos

Se aisló ADN genómico de *Escherichia coli* TOP10 utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), y se midió la concentración de ADN utilizando el kit de ensayo Quant-iT dsDNA BR y el fluorímetro Qubit (Life Technologies). Para la detección y cuantificación del ADN genómico de *E. coli* utilizando PCR cuantitativa (PCRc), se utilizó una pequeña región del gen ARNr23S, altamente conservado, para diseñar un cebador/sonda preparado como se describe en (Smith GJ III *et al.*; 1999; Biotechniques 26(3): 518-22, 524, 526). En el genoma de *E. coli* este gen está presente en siete copias.

En general, la PCRc se hizo en un Smart Cycler II (Cepheid) en reacciones de 25 µl que contenían 12,5 µl de mezcla maestra de PCRc Brilliant 2x (Stratagene) o mezcla maestra TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems), cada primer 3 µM y sonda 1 µM, DTT 1 mM, ADN genómico de *E. coli* 1 o 10 pg, y diversas cantidades de la enzima mutante P214A o ADNasa I (Sigma). La reacción de PCRc se realizó como sigue: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Cebadores/sonda:

Ecoli_23S_direct: 5'-GAAAGGCGCGGATACAG -3'[SEC ID N°: 12]
Ecoli_23S_inv: 5'-GTCCCGCCCTACTCATCG A-3'[SEC ID N°: 13]
Ecoli_23S_sonda: 5'-FAM-CCCCGTACACAAAAATGCACATGCTG-BHQ-3' [SEC ID N°: 14]

Efecto del mutante P214A sobre la integridad del cebador/sonda (ADN mc)

Este experimento probaba si el mutante P214A tiene un efecto inhibitorio sobre un protocolo de PCRc, a través de la degradación de los cebadores/sonda en una mezcla de PCRc (es decir, degradación de ADN monocatenario).

Las mezclas de reacción, como se describe anteriormente (mezcla maestra de PCRc Brilliant), se prepararon sin ADN (genómico de *E. coli*) molde y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se hizo una etapa de inactivación de 95 °C durante 10 minutos antes de añadir como molde 10 pg de ADN genómico de *E. coli*. Después se realizó la amplificación PCRc como se describe anteriormente.

La etapa de incubación a 37 °C permite que el mutante P214A catalice la degradación de ADN. La incubación a 95 °C durante 10 minutos inactiva de forma completa al mutante antes de añadir ADN molde. Por lo tanto, cualquier inhibición de los resultados de la PCRc puede deberse solo a una actividad nucleasa contra ADN mc (los cebadores/sonda se han degradado). Como se muestra en la Figura 12, el resultado de la PCRc no se afecta por la adición de hasta 1 U de mutante P214A, indicando que no tiene actividad medible contra los cebadores/sonda en la mezcla de reacción de PCRc.

Comparación de la termoinestabilidad de la ADNasa I y del mutante P214A en un protocolo de PCRc

Se prepararon mezclas de reacción como se describe anteriormente, sin ADN molde en ausencia o presencia de ADNasa I (1 U) o P214A (1 U). Después, una etapa de incubación de 37 °C durante 10 minutos se siguió de una

etapa de inactivación de 50 °C o de 55 °C durante 15 minutos. Después se añadió a las mezclas 1 pg de ADN genómico de *E. coli* y se realizó la PCRc como se describe anteriormente.

Para tener en cuenta tiempos variables de preparación de la reacción en los experimentos de PCRc, las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de someterlas a la amplificación. Cualquier actividad ADNasa residual en la mezcla de reacción degradará el ADN molde e inhibirá los resultados de la PCRc.

Como se ilustra en la Figura 13, el mutante P214A no inhibe la PCRc en comparación con la reacción de control (control (- Enz); sin enzima añadida) y así, en este experimento, se puede considerar inactivado de forma completa mediante una etapa de incubación de 15 minutos a 50 °C. La enzima ADNasa I no está inactivada, y el Ct se cambia en más de 8, indicando actividad restante alta después de la etapa de inactivación y/o actividad contra los cebadores/sonda en la mezcla de reacción.

Eliminación de ADN adicionado de las mezclas de reacción de PCRc

Para probar la capacidad del mutante P214A para eliminar ADN "contaminante", diversas cantidades de mutante P214A a las mezclas de reacción de PCRc descritas anteriormente (mezcla maestra TaqMan Gene Expression), adicionadas con 1 pg de ADN genómico de *E. coli*. Después, las mezclas de reacción se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y después se incubaron a 60 °C durante 15 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 14. Como puede observarse, 0,25 U o más del mutante P214A por 25 µl de mezcla de reacción provoca que el Ct aumente en más de 8. Esto indica una reducción de >250 veces en la concentración del ADN adicionado.

Además de los resultados individuales discutidos anteriormente, debería indicarse que los controles sin molde (CSM) dan resultados positivos para la muestra maestra de PCRc Brilliant (Stratagene) y la muestra maestra TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems). Esto ilustra el problema del ADN contaminante en las mezclas de PCRc cuando se utilizan cebadores universales dirigidos a ADN bacteriano o de *E. coli*, para la detección o el diagnóstico de bacterias.

EJEMPLO 8 - Efecto del mutante P214A en la eficacia de la RT-PCR de una etapa.

El experimento descrito en el Ejemplo 5 se repitió con varias concentraciones del mutante P214A para investigar como cantidades crecientes de la enzima afectaban la sensibilidad de la reacción de RT-PCR. Se probaron cinco concentraciones distintas variando de 0 a 1 U de ADNasa y los resultados se presentan en la Figura 15. El uso de 0,1-0,5 U de ADNasa no afecta a la sensibilidad de la RT-PCR. El uso de 1 U de la enzima disminuye la sensibilidad, con un Ct de 1,5.

EJEMPLO 9 - Eliminación de contaminantes de ADN bacteriano de productos de PCR comerciales

Se ha demostrado (Ejemplo 7) que, con frecuencia, están presentes trazas de ADN bacteriano en las mezclas comerciales de reacción de amplificación de ácidos nucleicos (las así llamadas "mezclas maestras"). Con frecuencia, este es un problema en los experimentos de PCRc para la detección de patógenos, ya que la amplificación de estos contaminantes conduce a positivos falsos, incluso en los controles sin molde (CSM). En este ejemplo, se añadió 1 U de mutante P214A de ADNasa a las mezclas maestras de PCRc de cuatro proveedores distintos y se preincubó durante 10 minutos a 37 °C. Después de esto, las mezclas maestras se incubaron a 60 °C durante 15 minutos, y se compararon con las mezclas maestras no tratadas en una reacción de PCRc como se describe en el Ejemplo 7. No se añadió molde a ninguna reacción. Los resultados se muestran en la Figura 16, y puede observarse que solo las mezclas maestras preincubadas con la enzima proporcionaron CSM negativos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biotec Pharmacon ASA

<120> Un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos en reacciones de transcripción inversa y amplificación

<130> 59,101823/02

<150> GB0912637.6

<151> 21-07-2009

<150> US61/235177

<151> 19-08-2009

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> *Pandalus borealis*

5

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(23)

10 <400> 1

```

Met Ile Gly Arg Thr Thr Phe Ile Ala Leu Phe Val Lys Val Leu Thr
1      5      10      15

Ile Trp Ser Phe Thr Lys Gly Glu Asp Cys Val Trp Asp Asn Asp Val
20     25     30

Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro Leu Ile Leu Asp Ser Ser Phe Gln Leu
35     40     45

Val Leu Pro Val Leu Glu Gly Asp Gln Arg Ile Thr Ser Val Gln Ser
50     55     60

Gly Ser Lys Leu Ile Leu Ala Cys Pro Gly Arg Gly Ile Ser Ala Leu
65     70     75     80

Gly Ser Glu Asp Ala Gln Ala Thr Cys Leu Gly Gly Lys Leu Val Glu
85     90     95

Val Asp Gly Lys Glu Trp Asn Ile Val Glu Leu Gly Cys Thr Lys Met
100    105    110

Ala Ser Glu Thr Ile His Arg Asn Leu Gly Gln Cys Gly Asp Gln Asp
115    120    125

Leu Gly Ile Tyr Glu Val Ile Gly Phe Asp Leu Pro Thr Thr Gly His
130    135    140

Phe Tyr Glu Leu Ile Arg Val Cys Phe Asp Pro Ala Asn Glu Thr Thr
    
```

ES 2 562 155 T3

145 150 155 160
 Ile Phe Ser Glu Asn Ile Val His Gly Ala Ser Ile Ala Ala Lys Asp
 165 170 175
 Ile Asp Pro Gly Arg Pro Ser Phe Lys Thr Ser Thr Gly Phe Phe Ser
 180 185 190
 Val Ser Met Ile Ser Val Tyr Ser Gln Arg Ser Gln Leu Glu Leu Met
 195 200 205
 Lys Asn Leu Leu Gly Asp Asp Glu Leu Ala Ala Thr Ile Ile Asp Pro
 210 215 220
 Ser Glu Gln Phe Tyr Phe Ala Lys Gly His Met Ala Pro Asp Ala Asp
 225 230 235 240
 Phe Val Thr Val Val Glu Gln Asp Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ile Asn Ala
 245 250 255
 Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe Asn Asn Gly Asn Trp Lys Tyr Leu Glu
 260 265 270
 Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala Glu Lys His Gly Thr Asp Leu Thr Val
 275 280 285
 Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val Leu Glu Leu Glu Asp Ile Asn Gly Asn
 290 295 300
 Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly Leu Ala Gln Asp Lys Lys Val Val Pro
 305 310 315 320
 Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys Val Ile Tyr Glu Lys Asp Thr Asn Arg
 325 330 335
 Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro
 340 345 350
 Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile Cys Ser Ser Leu Thr Trp Leu Asp Phe
 355 360 365
 Asp Phe Gly Asp Leu Val His Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ser Val Ala
 370 375 380
 Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Asn Val Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp
 385 390 395 400
 Ile Leu Asp Glu

<210> 2
 <211> 1791
 <212> ADN
 <213> *Pandalus borealis*

<220>
 <211> CDS
 <222> (23)..(1237)

<220>

<221> péptido señal

<222> (23)..(91)

5 <400> 2

cagtcagaac tgttgaggag ca atg ata ggc cgg acc act ttc ata gct tta	52
Met Ile Gly Arg Thr Thr Phe Ile Ala Leu	
1 5 10	
ttc gta aaa gtt ctg act att tgg agc ttt acc aaa ggt gag gac tgt	100
Phe Val Lys Val Leu Thr Ile Trp Ser Phe Thr Lys Gly Glu Asp Cys	
15 20 25	
gtc tgg gac aat gat gta gac tat cct gag tat cct cct ctg atc ctg	148
Val Trp Asp Asn Asp Val Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro Leu Ile Leu	
30 35 40	
gat tca tcc ttt cag ctg gtt ctg cca gtg ttg gaa gga gac caa agg	196
Asp Ser Ser Phe Gln Leu Val Leu Pro Val Leu Glu Gly Asp Gln Arg	
45 50 55	
ata acc agt gtc caa tct ggg agt aag ctg atc ttg gct tgt cct ggg	244
Ile Thr Ser Val Gln Ser Gly Ser Lys Leu Ile Leu Ala Cys Pro Gly	
60 65 70	
agg gga att tca gcc ctg ggg tca gag gat gca caa gcc act tgt ctt	292
Arg Gly Ile Ser Ala Leu Gly Ser Glu Asp Ala Gln Ala Thr Cys Leu	
75 80 85 90	
ggg ggc aag ctc gtc gaa gtc gat ggc aaa gaa tgg aat ata gtc gaa	340
Gly Gly Lys Leu Val Glu Val Asp Gly Lys Glu Trp Asn Ile Val Glu	
95 100 105	
ctc ggc tgc aca aaa atg gca tct gaa acc atc cat aga aac ctt gga	388
Leu Gly Cys Thr Lys Met Ala Ser Glu Thr Ile His Arg Asn Leu Gly	
110 115 120	
caa tgt ggt gat caa gac ctg gga att tac gaa gtc att ggt ttc gac	436
Gln Cys Gly Asp Gln Asp Leu Gly Ile Tyr Glu Val Ile Gly Phe Asp	
125 130 135	
ctt cca aca acg gga cac ttc tat gaa ttg ata cga gtt tgc ttt gac	484
Leu Pro Thr Thr Gly His Phe Tyr Glu Leu Ile Arg Val Cys Phe Asp	
140 145 150	
ccg gca aat gag acc act att ttt tcc gag aac atc gtt cac gga gcc	532
Pro Ala Asn Glu Thr Thr Ile Phe Ser Glu Asn Ile Val His Gly Ala	
155 160 165 170	
agc atc gcc gcc aaa gac att gac ccg ggt cgt cca tct ttc aaa aca	580
Ser Ile Ala Ala Lys Asp Ile Asp Pro Gly Arg Pro Ser Phe Lys Thr	
175 180 185	
tcc act ggg ttc ttc agt gta tcg atg ata tct gtc tat tcg caa aga	628
Ser Thr Gly Phe Phe Ser Val Ser Met Ile Ser Val Tyr Ser Gln Arg	
190 195 200	
agt cag ctg gag ctc atg aag aac ctc tta gga gat gat gaa tta gct	676
Ser Gln Leu Glu Leu Met Lys Asn Leu Leu Gly Asp Asp Glu Leu Ala	

ES 2 562 155 T3

205	210	215	
gcg aca atc atc gat cct tca gag cag ttc tac ttt gct aaa gga cat Ala Thr Ile Ile Asp Pro Ser Glu Gln Phe Tyr Phe Ala Lys Gly His 220 225 230			724
atg gct cct gac gcg gac ttt gtg aca gta gtt gag cag gac gca aca Met Ala Pro Asp Ala Asp Phe Val Thr Val Val Glu Gln Asp Ala Thr 235 240 245 250			772
tac tat tac atc aac gcg ttg cct caa tgg cag gcc ttt aac aat gga Tyr Tyr Tyr Ile Asn Ala Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe Asn Asn Gly 255 260 265			820
aac tgg aag tac ttg gaa tac gac acc cgt gac ctg gct gaa aaa cat Asn Trp Lys Tyr Leu Glu Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala Glu Lys His 270 275 280			868
ggc act gac ctg acc gtc tac agt ggt ggc tgg ggg gtt cta gag ctt Gly Thr Asp Leu Thr Val Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val Leu Glu Leu 285 290 295			916
gaa gac atc aac gga aac ccc gtt gaa atc tat ctt ggc ctc gcc cag Glu Asp Ile Asn Gly Asn Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly Leu Ala Gln 300 305 310			964
gac aaa aaa gtt gtc cct gct cct gca tta aca tgg aag gtg atc tat Asp Lys Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys Val Ile Tyr 315 320 325 330			1012
gag aag gac act aac cga gct gct gct att gtt gga ata aac aac ccc Glu Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile Asn Asn Pro 335 340 345			1060
cac atc acc acg gca cca gaa cct ctt tgt acc gac atc tgc tcc agc His Ile Thr Thr Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile Cys Ser Ser 350 355 360			1108
ctc aca tgg ctg gac ttt gat ttt ggg gac ctt gtc cat ggc tac acc Leu Thr Trp Leu Asp Phe Asp Phe Gly Asp Leu Val His Gly Tyr Thr 365 370 375			1156
tac tgc tgc tct gta gct gat ctc agg gca gcc att ccc aat gtt cca Tyr Cys Cys Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Asn Val Pro 380 385 390			1204
gat tta gga gac gtt gat atc tta gac gaa taa aagatattca cgtactacaa Asp Leu Gly Asp Val Asp Ile Leu Asp Glu 395 400			1257
ccatacaaag agagtgattg ctgtaccttt aactaaagggt ctggacctgg taacatgctt			1317
atgtagttaaa tgggtgtcgag gaattcatca atcagagrag aactactttca aagagggaaa			1377
aattaatcgc aatttttgtt cattacaagt ataatactta tcttattaca atttcgagta			1437
cgatttttaaa ggatakatcc acacacttat gcacaaagtg atcatcaagt tatacagtct			1497
tcattaaaac ataagcagtc attacggcat gtttcattca gaagttttca agatattgat			1557
tgccattctc gatttcttga aagatgtgca cacatgtgga gaagaaatgt aaacatctta			1617
aaattcatalc tctggatatac cagatattat gcacacaaaa tgtcaagtct cctgcctgct			1677
tctttggaaa gatgtgcata tgcacgcaca tgtaaccatg agattcacaa aatgtaatca			1737
tctcttaatc aaaacctaata cagtcattca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa			1791

<210> 3

<211> 404

5 <212> PRT

<213> *Pandalus borealis*

<220>

<221> SEÑAL
<222> (1)..(23)

<220>

5 <221> MUTAGEN
<222> (237)..(237)

<400> 3

```

Met Ile Gly Arg Thr Thr Phe Ile Ala Leu Phe Val Lys Val Leu Thr
 1           5           10           15

Ile Trp Ser Phe Thr Lys Gly Glu Asp Cys Val Trp Asp Asn Asp Val
          20           25           30

Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro Leu Ile Leu Asp Ser Ser Phe Gln Leu
          35           40           45

Val Leu Pro Val Leu Glu Gly Asp Gln Arg Ile Thr Ser Val Gln Ser
 50           55           60

Gly Ser Lys Leu Ile Leu Ala Cys Pro Gly Arg Gly Ile Ser Ala Leu
65           70           75           80

Gly Ser Glu Asp Ala Gln Ala Thr Cys Leu Gly Gly Lys Leu Val Glu
          85           90           95

Val Asp Gly Lys Glu Trp Asn Ile Val Glu Leu Gly Cys Thr Lys Met
          100          105          110

Ala Ser Glu Thr Ile His Arg Asn Leu Gly Gln Cys Gly Asp Gln Asp
          115          120          125

Leu Gly Ile Tyr Glu Val Ile Gly Phe Asp Leu Pro Thr Thr Gly His
130          135          140

Phe Tyr Glu Leu Ile Arg Val Cys Phe Asp Pro Ala Asn Glu Thr Thr
145          150          155          160

Ile Phe Ser Glu Asn Ile Val His Gly Ala Ser Ile Ala Ala Lys Asp
          165          170          175

Ile Asp Pro Gly Arg Pro Ser Phe Lys Thr Ser Thr Gly Phe Phe Ser
          180          185          190

Val Ser Met Ile Ser Val Tyr Ser Gln Arg Ser Gln Leu Glu Leu Met
          195          200          205

```

10

Lys Asn Leu Leu Gly Asp Asp Glu Leu Ala Ala Thr Ile Ile Asp Pro
210 215 220

Ser Glu Gln Phe Tyr Phe Ala Lys Gly His Met Ala Ala Asp Ala Asp
225 230 235 240

Phe Val Thr Val Val Glu Gln Asp Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ile Asn Ala
245 250 255

Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe Asn Asn Gly Asn Trp Lys Tyr Leu Glu
260 265 270

Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala Glu Lys His Gly Thr Asp Leu Thr Val
275 280 285

Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val Leu Glu Leu Glu Asp Ile Asn Gly Asn
290 295 300

Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly Leu Ala Gln Asp Lys Lys Val Val Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys Val Ile Tyr Glu Lys Asp Thr Asn Arg
325 330 335

Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro
340 345 350

Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile Cys Ser Ser Leu Thr Trp Leu Asp Phe
355 360 365

Asp Phe Gly Asp Leu Val His Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ser Val Ala
370 375 380

Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Asn Val Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp
385 390 395 400

Ile Leu Asp Glu

<210> 4
<211> 1791
5 <212> ADN
<213> *Pandalus borealis*

<220>
<211> CDS
10 <222> (23)..(1237)

<220>
<221> péptido señal
<222> (23)..(91)

<220>
<221> mutación
<222> (731)..(731)

20 <400> 4

cagtcagaac tggtgaggag ca atg ata ggc cgg acc act ttc ata gct tta	52
Met Ile Gly Arg Thr Thr Phe Ile Ala Leu	
1 5 10	
ttc gta aaa gtt ctg act att tgg agc ttt acc aaa ggt gag gac tgt	100
Phe Val Lys Val Leu Thr Ile Trp Ser Phe Thr Lys Gly Glu Asp Cys	
15 20 25	
gtc tgg gac aat gat gta gac tat cct gag tat cct cct ctg atc ctg	148
Val Trp Asp Asn Asp Val Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro Leu Ile Leu	
30 35 40	
gat tca tcc ttt cag ctg gtt ctg cca gtg ttg gaa gga gac caa agg	196
Asp Ser Ser Phe Gln Leu Val Leu Pro Val Leu Glu Gly Asp Gln Arg	
45 50 55	
ata acc agt gtc caa tct ggg agt aag ctg atc ttg gct tgt cct ggg	244
Ile Thr Ser Val Gln Ser Gly Ser Lys Leu Ile Leu Ala Cys Pro Gly	
60 65 70	
agg gga att tca gcc ctg ggg tca gag gat gca caa gcc act tgt ctt	292
Arg Gly Ile Ser Ala Leu Gly Ser Glu Asp Ala Gln Ala Thr Cys Leu	
75 80 85 90	
ggg ggc aag ctc gtc gaa gtc gat ggc aaa gaa tgg aat ata gtc gaa	340
Gly Gly Lys Leu Val Glu Val Asp Gly Lys Glu Trp Asn Ile Val Glu	
95 100 105	
ctc ggc tgc aca aaa atg gca tct gaa acc atc cat aga aac ctt gga	388
Leu Gly Cys Thr Lys Met Ala Ser Glu Thr Ile His Arg Asn Leu Gly	
110 115 120	
caa tgt ggt gat caa gac ctg gga att tac gaa gtc att ggt ttc gac	436
Gln Cys Gly Asp Gln Asp Leu Gly Ile Tyr Glu Val Ile Gly Phe Asp	
125 130 135	
ctt cca aca acg gga cac ttc tat gaa ttg ata cga gtt tgc ttt gac	484
Leu Pro Thr Thr Gly His Phe Tyr Glu Leu Ile Arg Val Cys Phe Asp	
140 145 150	
ccg gca aat gag acc act att ttt tcc gag aac atc gtt cac gga gcc	532
Pro Ala Asn Glu Thr Thr Ile Phe Ser Glu Asn Ile Val His Gly Ala	
155 160 165 170	
agc atc gcc gcc aaa gac att gac ccg ggt cgt cca tct ttc aaa aca	580
Ser Ile Ala Ala Lys Asp Ile Asp Pro Gly Arg Pro Ser Phe Lys Thr	
175 180 185	
tcc act ggg ttc ttc agt gta tgc atg ata tct gtc tat tgc caa aga	628
Ser Thr Gly Phe Phe Ser Val Ser Met Ile Ser Val Tyr Ser Gln Arg	
190 195 200	
agt cag ctg gag ctc atg aag aac ctc tta gga gat gat gaa tta gct	676
Ser Gln Leu Glu Leu Met Lys Asn Leu Leu Gly Asp Asp Glu Leu Ala	
205 210 215	
gcg aca atc atc gat cct tca gag cag ttc tac ttt gct aaa gga cat	724
Ala Thr Ile Ile Asp Pro Ser Glu Gln Phe Tyr Phe Ala Lys Gly His	
220 225 230	
atg gct gct gac gcg gac ttt gtg aca gta gtt gag cag gac gca aca	772
Met Ala Ala Asp Ala Asp Phe Val Thr Val Val Glu Gln Asp Ala Thr	
235 240 245 250	

tac tat tac atc aac gcg ttg cct caa tgg cag gcc ttt aac aat gga Tyr Tyr Tyr Ile Asn Ala Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe Asn Asn Gly 255 260 265	820
aac tgg aag tac ttg gaa tac gac acc cgt gac ctg gct gaa aaa cat Asn Trp Lys Tyr Leu Glu Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala Glu Lys His 270 275 280	868
ggc act gac ctg acc gtc tac agt ggt ggc tgg ggg gtt cta gag ctt Gly Thr Asp Leu Thr Val Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val Leu Glu Leu 285 290 295	916
gaa gac atc aac gga aac ccc gtt gaa atc tat ctt ggc ctc gcc cag Glu Asp Ile Asn Gly Asn Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly Leu Ala Gln 300 305 310	964
gac aaa aaa gtt gtc cct gct cct gca tta aca tgg aag gtg atc tat Asp Lys Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys Val Ile Tyr 315 320 325 330	1012
gag aag gac act aac cga gct gct gct att gtt gga ata aac aac ccc Glu Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile Asn Asn Pro 335 340 345	1060
cac atc acc acg gca cca gaa cct ctt tgt acc gac atc tgc tcc agc His Ile Thr Thr Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile Cys Ser Ser 350 355 360	1108
ctc aca tgg ctg gac ttt gat ttt ggg gac ctt gtc cat ggc tac acc Leu Thr Trp Leu Asp Phe Asp Phe Gly Asp Leu Val His Gly Tyr Thr 365 370 375	1156
tac tgc tgc tct gta gct gat ctc agg gca gcc att ccc aat gtt cca Tyr Cys Cys Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Asn Val Pro 380 385 390	1204
gat tta gga gac gtt gat atc tta gac gaa taa aagatattca cgtactacaa Asp Leu Gly Asp Val Asp Ile Leu Asp Glu 395 400	1257
ccatacaaaag agagtgattg ctgtaccttt aactaaagggt ctggacctgg taacatgctt	1317
atgtagttaa tgggtgtcgag gaattcatca atcagagrag aactacttca aagagggaaa	1377
aattaatcgc aatttttgtt cattacaagt ataatactta tcttattaca atttcgagta	1437
cgattttaaa ggatakatcc acacacttat gcacaaaagt atcatcaagt tatacagtct	1497
tcattaaaac ataagcagtc attacggcat gtttcattca gaagttttca agatattgat	1557
tgccattctc gattttctga aagatgtgca cacatgtgga gaagaaatgt aaacatctta	1617
aaattcatat tctggatata cagatattat gcacacaaaa tgtcaagtct cctgcctgct	1677
tctttggaaa gatgtgcata tgcacgcaca tgtaaccatg agattcacia aatgtaatca	1737
tctcttaatc aaaacctaata cagtcattca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	1791

<210> 5
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> *Pandalus borealis*

<400> 5

Glu Asp Cys Val Trp Asp Asn Asp Val Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro 1 5 10 15
--

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

Leu Ala Gln Asp Lys Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys
 290 295 300

Val Ile Tyr Glu Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile
 305 310 315 320

Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile
 325 330 335

Cys Ser Ser Leu Thr Trp Leu Asp Phe Asp Phe Gly Asp Leu Val His
 340 345 350

Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro
 355 360 365

Asn Val Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp Ile Leu Asp Glu
 370 375 380

<210> 6
 <211> 1146
 5 <212> ADN
 <213> *Pandalus borealis*

<220>
 <211> CDS
 10 <222> (1)..(1146)

<400> 6

gag gac tgt gtc tgg gac aat gat gta gac tat cct gag tat cct cct Glu Asp Cys Val Trp Asp Asn Asp Val Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro 1 5 10 15	48
ctg atc ctg gat tca tcc ttt cag ctg gtt ctg cca gtg ttg gaa gga Leu Ile Leu Asp Ser Ser Phe Gln Leu Val Leu Pro Val Leu Glu Gly 20 25 30	96
gac caa agg ata acc agt gtc caa tct ggg agt aag ctg atc ttg gct Asp Gln Arg Ile Thr Ser Val Gln Ser Gly Ser Lys Leu Ile Leu Ala 35 40 45	144
tgt cct ggg agg gga att tca gcc ctg ggg tca gag gat gca caa gcc Cys Pro Gly Arg Gly Ile Ser Ala Leu Gly Ser Glu Asp Ala Gln Ala 50 55 60	192
act tgt ctt ggt ggc aag ctc gtc gaa gtc gat ggc aaa gaa tgg aat Thr Cys Leu Gly Gly Lys Leu Val Glu Val Asp Gly Lys Glu Trp Asn 65 70 75 80	240
ata gtc gaa ctc ggc tgc aca aaa atg gca tct gaa acc atc cat aga Ile Val Glu Leu Gly Cys Thr Lys Met Ala Ser Glu Thr Ile His Arg 85 90 95	288
aac ctt gga caa tgt ggt gat caa gac ctg gga att tac gaa gtc att Asn Leu Gly Gln Cys Gly Asp Gln Asp Leu Gly Ile Tyr Glu Val Ile 100 105 110	336
ggt ttc gac ctt cca aca acg gga cac ttc tat gaa ttg ata cga gtt Gly Phe Asp Leu Pro Thr Thr Gly His Phe Tyr Glu Leu Ile Arg val 115 120 125	384

ES 2 562 155 T3

tgc ttt gac ccg gca aat gag acc act att ttt tcc gag aac atc gtt Cys Phe Asp Pro Ala Asn Glu Thr Thr Ile Phe Ser Glu Asn Ile Val 130 135 140	432
cac gga gcc agc atc gcc gcc aaa gac att gac ccg ggt cgt cca tct His Gly Ala Ser Ile Ala Ala Lys Asp Ile Asp Pro Gly Arg Pro Ser 145 150 155 160	480
ttc aaa aca tcc act ggg ttc ttc agt gta tgc atg ata tct gtc tat Phe Lys Thr Ser Thr Gly Phe Phe Ser Val Ser Met Ile Ser Val Tyr 165 170 175	528
tcg caa aga agt cag ctg gag ctc atg aag aac ctc tta gga gat gat Ser Gln Arg Ser Gln Leu Glu Leu Met Lys Asn Leu Leu Gly Asp Asp 180 185 190	576
gaa tta gct gcg aca atc atc gat cct tca gag cag ttc tac ttt gct Glu Leu Ala Ala Thr Ile Ile Asp Pro Ser Glu Gln Phe Tyr Phe Ala 195 200 205	624
aaa gga cat atg gct cct gac gcg gac ttt gtg aca gta gtt gag cag Lys Gly His Met Ala Pro Asp Ala Asp Phe Val Thr Val Val Glu Gln 210 215 220	672
gac gca aca tac tat tac atc aac gcg ttg cct caa tgg cag gcc ttt Asp Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ile Asn Ala Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe 225 230 240	720
aac aat gga aac tgg aag tac ttg gaa tac gac acc cgt gac ctg gct Asn Asn Gly Asn Trp Lys Tyr Leu Glu Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala 245 250 255	768
gaa aaa cat ggc act gac ctg acc gtc tac agt ggt ggc tgg ggg gtt Glu Lys His Gly Thr Asp Leu Thr Val Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val 260 265 270	816
cta gag ctt gaa gac atc aac gga aac ccc gtt gaa atc tat ctt ggc Leu Glu Leu Glu Asp Ile Asn Gly Asn Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly 275 280 285	864
ctc gcc cag gac aaa aaa gtt gtc cct gct cct gca tta aca tgg aag Leu Ala Gln Asp Lys Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys 290 295 300	912
gtg atc tat gag aag gac act aac cga gct gct gct att gtt gga ata Val Ile Tyr Glu Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ala Ile Val Gly Ile 305 310 315 320	960
aac aac ccc cac atc acc acg gca cca gaa cct ctt tgt acc gac atc Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile 325 330 335	1008
tgc tcc agc ctc aca tgg ctg gac ttt gat ttt ggg gac ctt gtc cat Cys Ser Ser Leu Thr Trp Leu Asp Phe Asp Phe Gly Asp Leu Val His 340 345 350	1056
ggc tac acc tac tgc tgc tct gta gct gat ctc agg gca gcc att ccc Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro 355 360 365	1104
aat gtt cca gat tta gga gac gtt gat atc tta gac gaa taa Asn Val Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp Ile Leu Asp Glu 370 375 380	1146

<210> 7
 <211> 381
 5 <212> PRT
 <213> *Pandalus borealis*

<220>
 <221> MUTAGEN
 10 <222> (214)..(214)

<400> 7

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

Asn Asn Gly Asn Trp Lys Tyr Leu Glu Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala
245 250 255
Glu Lys His Gly Thr Asp Leu Thr Val Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val
260 265 270
Leu Glu Leu Glu Asp Ile Asn Gly Asn Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly
275 280 285
Leu Ala Gln Asp Lys Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys
290 295 300
Val Ile Tyr Glu Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile
305 310 315 320
Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile
325 330 335
Cys Ser Ser Leu Thr Trp Leu Asp Phe Asp Phe Gly Asp Leu Val His
340 345 350
Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro
355 360 365
Asn Val Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp Ile Leu Asp Glu
370 375 380

<210> 8
<211> 1146
5 <212> ADN
<213> *Pandalus borealis*

<220>
<211> CDS
10 <222> (1)..(1146)

<220>
<221> mutación
<222> (640)..(640)

15 <400> 8

gag gac tgt gtc tgg gac aat gat gta gac tat cct gag tat cct cct	48
Glu Asp Cys Val Trp Asp Asn Asp Val Asp Tyr Pro Glu Tyr Pro Pro	
1 5 10 15	
ctg atc ctg gat tca tcc ttt cag ctg gtt ctg cca gtg ttg gaa gga	96
Leu Ile Leu Asp Ser Ser Phe Gln Leu Val Leu Pro Val Leu Glu Gly	
20 25 30	
gac caa agg ata acc agt gtc caa tct ggg agt aag ctg atc ttg gct	144
Asp Gln Arg Ile Thr Ser Val Gln Ser Gly Ser Lys Leu Ile Leu Ala	
35 40 45	
tgt cct ggg agg gga att tca gcc ctg ggg tca gag gat gca caa gcc	192
Cys Pro Gly Arg Gly Ile Ser Ala Leu Gly Ser Glu Asp Ala Gln Ala	
50 55 60	

act tgt ctt ggt ggc aag ctc gtc gaa gtc gat ggc aaa gaa tgg aat Thr Cys Leu Gly Gly Lys Leu Val Glu Val Asp Gly Lys Glu Trp Asn 65 70 75 80	240
ata gtc gaa ctc ggc tgc aca aaa atg gca tct gaa acc atc cat aga Ile Val Glu Leu Gly Cys Thr Lys Met Ala Ser Glu Thr Ile His Arg 85 90 95	288
aac ctt gga caa tgt ggt gat caa gac ctg gga att tac gaa gtc att Asn Leu Gly Gln Cys Gly Asp Gln Asp Leu Gly Ile Tyr Glu Val Ile 100 105 110	336
ggt ttc gac ctt cca aca acg gga cac ttc tat gaa ttg ata cga gtt Gly Phe Asp Leu Pro Thr Thr His Phe Tyr Glu Leu Ile Arg Val 115 120 125	384
tgc ttt gac ccg gca aat gag acc act att ttt tcc gag aac atc gtt Cys Phe Asp Pro Ala Asn Glu Thr Thr Ile Phe Ser Glu Asn Ile Val 130 135 140	432
cac gga gcc agc atc gcc gcc aaa gac att gac ccg ggt cgt cca tct His Gly Ala Ser Ile Ala Lys Asp Ile Asp Pro Gly Arg Pro Ser 145 150 155 160	480
ttc aaa aca tcc act ggg ttc ttc agt gta tcg atg ata tct gtc tat Phe Lys Thr Ser Thr Gly Phe Phe Ser Met Ser Ile Ser Val Tyr 165 170 175	528
tcg caa aga agt cag ctg gag ctc atg aag aac ctc tta gga gat gat Ser Gln Arg Ser Gln Leu Glu Leu Met Lys Asn Leu Leu Gly Asp Asp 180 185 190	576
gaa tta gct gcg aca atc atc gat cct tca gag cag ttc tac ttt gct Glu Leu Ala Ala Thr Ile Ile Asp Pro Ser Glu Gln Phe Tyr Phe Ala 195 200 205	624
aaa gga cat atg gct gct gac gcg gac ttt gtg aca gta gtt gag cag Lys Gly His Met Ala Ala Asp Ala Asp Phe Val Thr Val Val Glu Gln 210 215 220	672
gac gca aca tac tat tac atc aac gcg ttg cct caa tgg cag gcc ttt Asp Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ile Asn Ala Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe 225 230 235 240	720
aac aat gga aac tgg aag tac ttg gaa tac gac acc cgt gac ctg gct Asn Asn Gly Asn Trp Lys Tyr Leu Glu Tyr Asp Thr Arg Asp Leu Ala 245 250 255	768
gaa aaa cat ggc act gac ctg acc gtc tac agt ggt ggc tgg ggg gtt Glu Lys His Gly Thr Asp Leu Thr Val Tyr Ser Gly Gly Trp Gly Val 260 265 270	816
cta gag ctt gaa gac atc aac gga aac ccc gtt gaa atc tat ctt ggc Leu Glu Leu Glu Asp Ile Asn Gly Asn Pro Val Glu Ile Tyr Leu Gly 275 280 285	864
ctc gcc cag gac aaa aaa gtt gtc cct gct cct gca tta aca tgg aag Leu Ala Gln Asp Lys Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Leu Thr Trp Lys 290 295 300	912
gtg atc tat gag aag gac act aac cga gct gct gct att gtt gga ata Val Ile Tyr Glu Lys Asp Thr Asn Arg Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile 305 310 315 320	960
aac aac ccc cac atc acc acg gca cca gaa cct ctt tgt acc gac atc Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp Ile 325 330 335	1008

ES 2 562 155 T3

tgc tcc agc ctc aca tgg ctg gac ttt gat ttt ggg gac ctt gtc cat	1056
Cys Ser Ser Ser Leu Thr Trp Leu Asp Phe Asp Phe Gly Asp Leu Val His	
340 345 350	
ggc tac acc tac tgc tgc tct gta gct gat ctc agg gca gcc att ccc	1104
Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro	
355 360 365	
aat gtt cca gat tta gga gac gtt gat atc tta gac gaa taa	1146
Asn Val Pro Asp Leu Gly Asp Val Asp Ile Leu Asp Glu	
370 375 380	

<210> 9

<211> 23

5 <212> PRT

<213> *Pandalus borealis*

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(23)

<400> 9

Met Ile Gly Arg Thr Thr Phe Ile Ala Leu Phe Val Lys Val Leu Thr
1 5 10 15

Ile Trp Ser Phe Thr Lys Gly
20

15

<210> 10

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Sonda de oligonucleótido marcada con FAM en 5' y TAMRA en 3' para medir actividad ADNasa

<400> 10

25

cgccatcgga gggtc	15
------------------	----

<210> 11

<211> 15

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia complementaria de SEC ID N°: 10

35

<400> 11

gaacctccga tggcg	15
------------------	----

40

<210> 12

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> Cebador directo para amplificar una sección del gen ARNr23S de *E. coli*

<400> 12

50

gaaaggcgcg cgatacag	18
---------------------	----

<210> 13

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Primer inverso para amplificar una sección de ARNr23S de *E. coli*

<400> 13

10 gtcccgccct actcatcga 19

<210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de oligonucleótido marcada con FAM en 5' y BHQ en 3' complementaria a una sección del gen ARNr23S de *E. coli* entre las regiones complementarias a SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14

20 <400> 14

ccccgtacac aaaaatgcac atgctg 26

25 <210> 15
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> *Paralithodes camtschatica*

30 <400> 15

Gln	Asp	Cys	Val	Trp	Asp	Lys	Asp	Thr	Asp	Phe	Pro	Glu	Asp	Pro	Pro
1				5					10					15	
Leu	Ile	Phe	Asp	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Ile	Arg	Pro	Val	Leu	Glu	Asn
			20					25					30		
Gly	Lys	Arg	Ile	Val	Ser	Val	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Ala
		35					40					45			
Cys	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Ile	Asn	Leu	Gly	Met	Glu	Ala	Val	Glu	Ala
	50					55				60					
Lys	Cys	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Glu	Gly	Thr	Glu	Trp	Glu
65					70					75					80
Ile	Trp	Ser	Leu	Gly	Cys	Ser	Asn	His	Val	Lys	Glu	Thr	Ile	Arg	Arg
				85					90					95	
Asn	Leu	Gly	Thr	Cys	Gly	Glu	Ala	Asp	Gln	Gly	Asp	Arg	His	Ser	Ile
			100					105					110		
Gly	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Ile	Ser	Val
		115					120					125			

ES 2 562 155 T3

Cys Phe Gly Pro Val Ser Glu Thr Thr Leu Arg Thr Glu His Val Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Asn Ile Ala Ala Lys Asp Ile Glu Thr Ser Arg Pro Ser
 145 150 155 160
 Phe Lys Thr Ser Thr Gly Phe Phe Ser Val Ser Met Ser Thr Val Tyr
 165 170 175
 Ser Gln Ala Ser Gln Leu Gln Leu Met Thr Asp Ile Leu Gly Asp Ser
 180 185 190
 Asp Leu Ala Asn Asn Ile Ile Asp Pro Ser Gln Gln Leu Tyr Phe Ala
 195 200 205
 Lys Gly His Met Ser Pro Asp Ala Asp Phe Val Thr Val Ala Glu Gln
 210 215 220
 Asp Ala Thr Tyr Tyr Phe Ile Asn Ala Leu Pro Gln Trp Gln Ala Phe
 225 230 235 240
 Asn Asn Gly Asn Trp Lys Tyr Leu Glu Tyr Ala Thr Arg Asp Leu Ala
 245 250 255
 Glu Ser His Gly Ser Asp Leu Arg Val Tyr Ser Gly Gly Trp Ser Leu
 260 265 270
 Leu Gln Leu Asp Asp Ile Asn Gly Asn Pro Val Asp Ile Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Ser Glu Gly Lys Glu Val Val Pro Val Pro Ser Leu Thr Trp Lys
 290 295 300
 Val Val Tyr Glu Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Ala Ile Val Gly Ile
 305 310 315 320
 Asn Asn Pro His Ile Thr Thr Ala Pro Ser Pro Leu Cys Ser Asp Leu
 325 330 335
 Cys Ser Ser Leu Thr Trp Ile Asp Phe Asn Leu Asp Asp Leu Ala His
 340 345 350
 Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Ala Val Asp Asp Leu Arg Gln Ala Ile Pro
 355 360 365
 Tyr Ile Pro Asp Leu Gly Asn Val Gly Leu Leu Thr Asn
 370 375 380

REIVINDICACIONES

1. Una ADNasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, teniendo dicha ADNasa la secuencia de SEC ID N°: 1 o una secuencia que es al menos el 60 % idéntica a ella, pero en la que el resto prolina en la posición 237 de SEC ID N°: 1, o la prolina equivalente en otras secuencias, se ha modificado, suprimido o sustituido, en la que dicha ADNasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma es
 - (i) inactivada de forma irreversible en al menos el 95 % mediante calentamiento a una temperatura de 50 °C durante 5 min en un tampón que consiste en Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM; y
 - (ii) sustancialmente específica para ADN bicatenario.
2. Una ADNasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha ADNasa tiene la secuencia de SEC ID N°: 5 o una secuencia que es al menos el 60 % idéntica a ella, pero en la que el resto prolina en la posición 214 de SEC ID N°: 5, o la prolina equivalente en otras secuencias, se ha modificado, suprimido o sustituido, en la que dicha ADNasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma es
 - (i) inactivada de forma irreversible en al menos el 95 % mediante calentamiento a una temperatura de 50 °C durante 5 min en un tampón que consiste en Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM; y
 - (ii) sustancialmente específica para ADN bicatenario.
3. Una ADNasa o un fragmento de la misma de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, teniendo dicha ADNasa la secuencia de una ADNasa obtenible a partir de una especie del filo *Arthropoda*, preferentemente a partir de una especie de un subfilo seleccionado de *Crustacea*, *Hexapoda*, *Chelicerata* o *Myriapoda*, pero en la que el resto prolina equivalente a la prolina en la posición 237 de SEC ID N°: 1 se ha modificado, suprimido o sustituido.
4. Una ADNasa o un fragmento de la misma de acuerdo con la reivindicación 3, teniendo dicha ADNasa la secuencia de una ADNasa obtenible a partir de una especie seleccionada de *Pandalus borealis*, *Paralithodes camtschaticus* (cangrejo rojo gigante), *Marsipenus japonicus* (camarón kuruma) o *Penaeus japonicus*, preferentemente *Pandalus borealis*, pero en la que el resto prolina equivalente a la prolina en la posición 237 de SEC ID N°: 1 se ha modificado, suprimido o sustituido.
5. Una ADNasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, teniendo dicha ADNasa la secuencia de SEC ID N°: 3 o de SEC ID N°: 7.
6. Un método para eliminar contaminación de ácidos nucleicos de
 - (i) una reacción de transcripción inversa, o
 - (ii) una PCR de arranque en caliente, en la que dicha reacción es una preparación de PCR de arranque en caliente barrera y/o implica una ADN polimerasa de arranque en caliente,
 método que comprende el uso de una ADNasa o un fragmento de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que una mezcla de reacción de transcripción inversa, una preparación de PCR de arranque en caliente, un mezcla de PCR de arranque en caliente, o cualquiera de los componentes individuales de las mismas, se pone en contacto con la ADNasa o fragmento de la misma en condiciones que permiten la digestión de cualquier ADN bicatenario contaminante y, posteriormente, la mezcla de reacción se calienta para inactivar la ADNasa o fragmento de la misma, preferentemente en el que la mezcla de reacción de la transcripción inversa es una mezcla completa y se calienta a la temperatura de trabajo de la enzima de transcripción inversa, para inactivar la ADNasa o fragmento de la misma.
8. Un método de transcripción inversa *in vitro* de un ácido nucleico diana, en el que dicho método incluye una etapa de tratamiento de la mezcla de reacción de transcripción inversa con una ADNasa o fragmento de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, antes del comienzo de la reacción de transcripción inversa existente, preferentemente en el que la mezcla de reacción de transcripción inversa es una mezcla completa y se calienta a la temperatura de trabajo de la enzima de transcripción inversa, para inactivar la ADNasa o fragmento de la misma.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicha reacción de transcripción inversa se sigue de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente en el que dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos es PCR, LCR, SDA, 3SR o LAMP.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la reacción de transcripción inversa y la reacción de amplificación se realizan en un único recipiente de reacción.

11. Un método de PCR de arranque en caliente, en el que dicha reacción es una preparación de PCR de arranque en caliente barrera y/o implica una ADN polimerasa de arranque en caliente, en el que dicho método incluye una etapa de tratamiento de la preparación/mezcla de PCR de arranque en caliente o de la ADN polimerasa de arranque en caliente, con una ADNasa o fragmento de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, antes del comienzo de la PCR de arranque en caliente.

12. Una molécula de ácido nucleico que codifica la ADNasa o fragmento de la misma, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, preferentemente en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 4 o de SEC ID N°: 8.

13. Un método para aislar y purificar una ADNasa o un fragmento de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho método expresar dicha ADNasa o fragmento de la misma en una célula hospedadora adecuada, y posteriormente separar la ADNasa o fragmento de la misma de dichas células hospedadoras y/o del medio en el que dichas células se han cultivado.

14. Un kit o composición para llevar a cabo un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, comprendiendo dicho kit o composición una ADNasa o fragmento de la misma, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12; y opcionalmente uno o más de los siguientes

- (i) un nucleótido trifosfato;
- (ii) un cebador de oligonucleótido;
- (iii) una enzima de transcripción inversa;
- (iv) una ADN polimerasa;
- (v) una ADN ligasa; y
- (vi) una enzima de restricción.

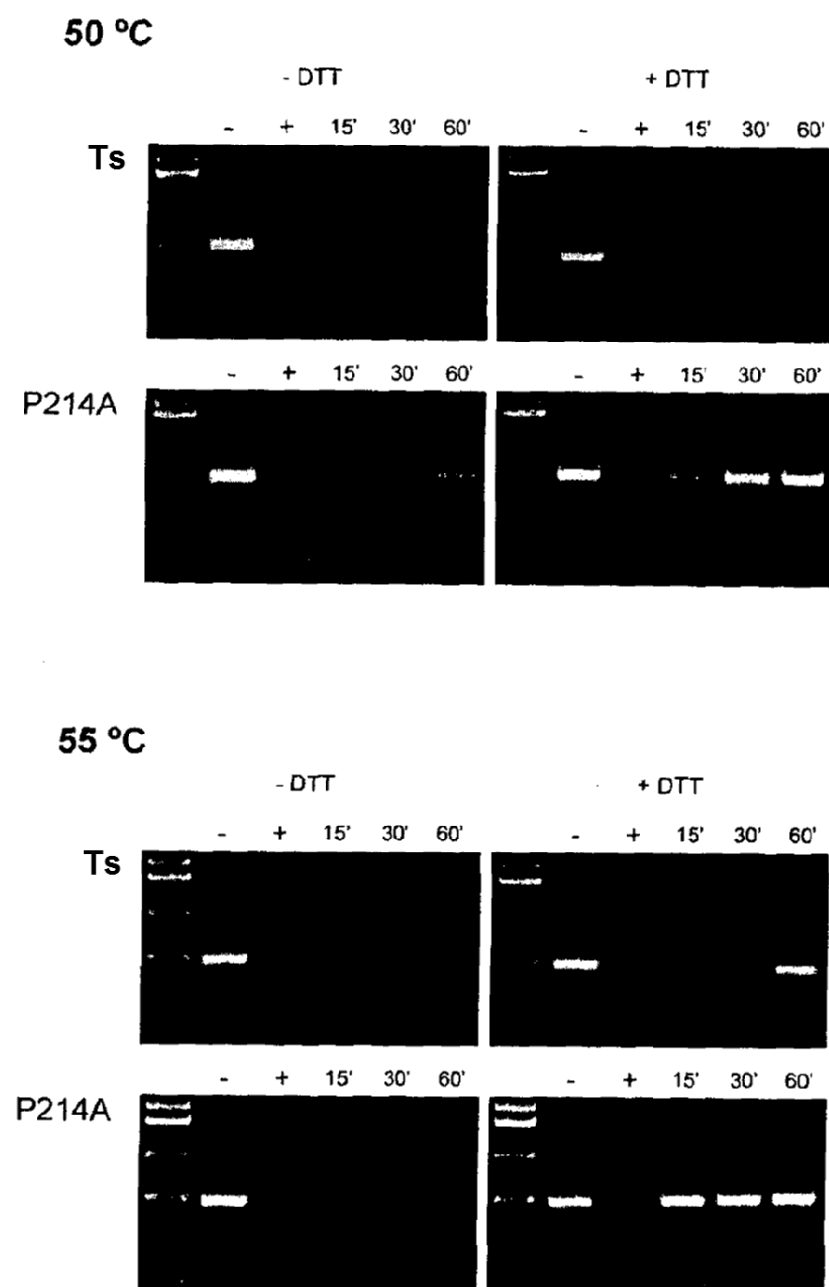


Figura 1a

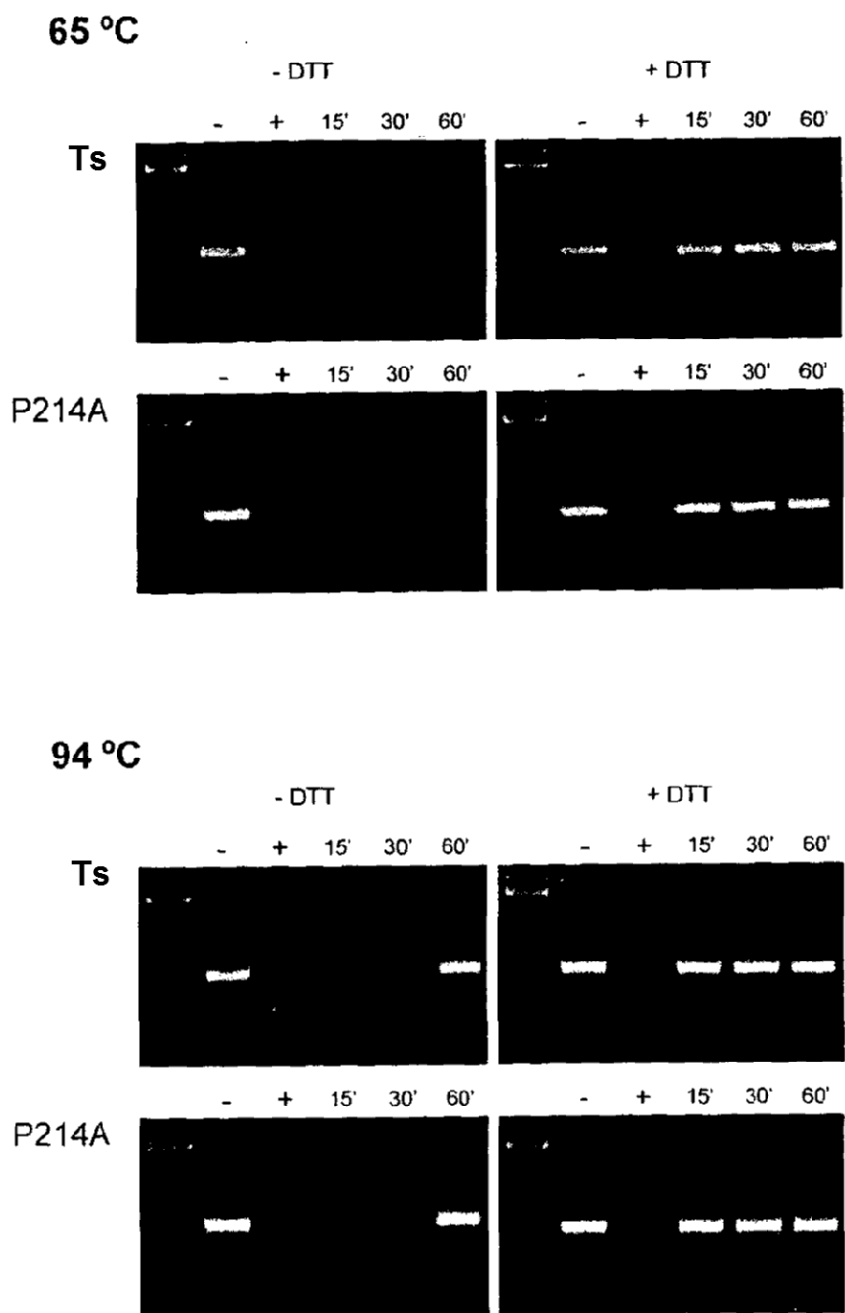


Figura 1b

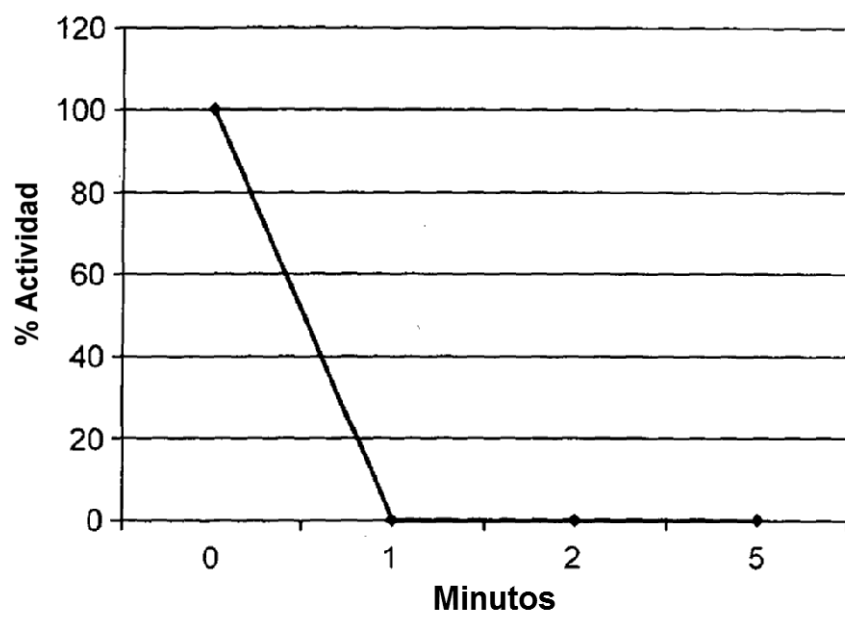


Figura 2

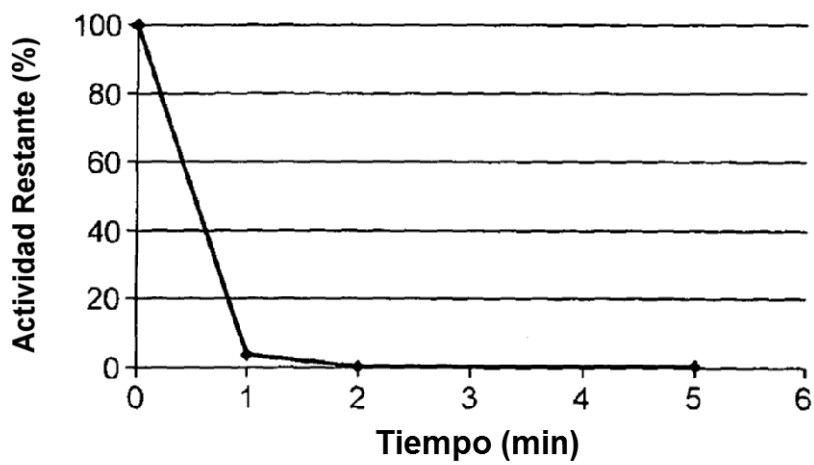


Figura 3

```

1   EDCVWDNDVDYPEYPPILLDSSFQLVLPVLEGDQRI'TSVQSGSKLILACPGRGISALGSE
61  DAQATCLGGKLVVDGKEWNI'VELGCTKMASETIHRNLGQCGDQDLGIYE'VIGFDLPTTG
121 HFYELIRVCFDPANETTIFSENIVHGASIAAKDIDPGRPSFKTSTGFFSVSMISVYSQRS
181 QLELMKNLLGDDELAATIIDPSEQFYFAKGHMAADADFVTVVEQDATYYIINALPQWQAF
241 NNGNWKYLEYDTRDLAEKHGTDLT'VYSGGWGVLELEDINGNPVEIYLG'LAQDKKVPAPA
301 L'TWKVIYEKDTNRAAAIVGINNPHITTAPEPLCTDICS'SLTWLDFD'FGDLVHGTYCCSV
361 ADLRAAIPNV'PD'LG'VDILDE

```

Figura 4

GAGGACTGTGTCTGGGACAATGATGTAGAC

TATCCTGAGTATCCTCCTCTGATCCTGGATTATCCTTTTCAGCTGGTTCTGCCAGTGTG 181

GAAGGAGACCAAAGGATAACCAGTGTCCAATCTGGGAGTAAGCTGATCTTGGCTTGTCT 241

GGGAGGGGAATTTTCAGCCCTGGGGTCAGAGGATGCACAAGCCACTTGTCTTGGTGGCAAG 301

CTCGTCGAAGTCGATGGCAAAGAATGGAATATAGTCGAACTCGGCTGCACAAAAATGGCA 361

TCTGAAACCATCCATAGAAACCTTGGACAATGTGGTGATCAAGACCTGGGAATTTACGAA 421

GTCATTGGTTTCGACCTTCCAACAACGGGACACTTCTATGAATTGATACGAGTTTGCTT 481

GACCCGGCAAATGAGACCACTATTTTTTCCGAGAACATCGTTCACGGAGCCAGCATCGCC 541

GCCAAAGACATTGACCCGGGTCTCCATCTTTCAAACATCCACTGGGTCTTCAGTGTA 601

TCGATGATATCTGTCTATTCGCAAAGAAGTCAGCTGGAGCTCATGAAGAACCTCTTAGGA 661

GATGATGAATTAGCTGCGACAATCATCGATCCTTCAGAGCAGTTCTACTTTGCTAAAGGA 721

CATATGGCT**GCT**GACGCGGACTTTGTGACAGTAGTTGAGCAGGACGCAACATACTATTAC 781

ATCAACCGCTTGCCCTCAATGGCAGGCCTTTAACAATGGAACTGGGAAGTACTTGGAATAC 841

GACACCCGTGACCTGGCTGAAAAACATGGCACTGACCTGACCGTCTACAGTGGTGGCTGG 901

GGGGTTCTAGAGCTTGAAGACATCAACGGAAACCCGTTGAAATCTATCTTGGCCTCGCC 961

CAGGACAAAAAGTTGTCCCTGCTCCTGCATTAACATGGAAGGTGATCTATGAGAAGGAC 1021

ACTAACCGAGCTGCTGCTATGTGGAATAAACAACCCCCACATCACCACGGCACCAGAA 1081

CCTCTTTGTACCGACATCTGCTCCAGCCTCACATGGCTGGACTTTGATTTTGGGGACCTT 1141

GTCCATGGCTACACCTACTGCTGCTCTGTAGCTGATCTCAGGGCAGCCATTCCCAATGTT 1201

CCAGATTTAGGAGACGTTGATATCTTAGACGAATAA

Figura 5

cagtcagaactggttgaggagcaATGATAGGCCGGACCACTTTCATAGCTTTATTTCGTAAAA	61
M I G R T T F I A L F V K	13
GTTCTGACTATTGGAGCTTTACCAAAGGTGAGGACTGTGTCTGGGACAATGATGTAGAC	121
V L T I W S F T K G E D C V W D N D V D	33
TATCCTGAGTATCCTCCTCTGATCCTGGATTTCATCCTTTCAGCTGGTTCGCCAGTGTG	181
Y P E Y P P L I L D S S F Q L V L P V L	53
GAAGGAGACCAAAGGATAACCAGTGTCCAATCTGGGAGTAAGCTGATCTGGCTTGTCT	241
E G D Q R I T S V Q S G S K L I L A C P	73
GGGAGGGGAATTCAGCCCTGGGGTCAGAGGATGCACAAGCCACTTGTCTTGGTGGCAAG	301
G R G I S A L G S E D A Q A T C L G G K	93
CTCGTCGAAGTCGATGGCAAAGAATGGAATATAGTCGAACCTCGGCTGCACAAAAATGGCA	361
L V E V D G K E W N I V E L G C T K M A	113
TCTGAAACCATCCATAGAAACCTTGGACAATGTGGTGATCAAGACCTGGGAATTTACGAA	421
S E T I H R N L G Q C G D Q D L G I Y E	133
GTCATTGGTTTCGACCTTCCAACAACGGGACACTTCTATGAATTGATACGAGTTTGCTTT	481
V I G F D L P T T G H F Y E L I R V C F	153
GACCCGGCAAATGAGACCACTATTTTTCGAGAACATCGTTCACGGAGCCAGCATCGCC	541
D P A N E T T I F S E N I V H G A S I A	173
GCCAAAGACATTGACCCGGGTCGTCCATCTTTCAAACATCCACTGGGTTCTTCAGTGTA	601
A K D I D P G R P S F K T S T G F F S V	193
TCGATGATATCTGTCTATTTCGCAAAGAAGTCAGCTGGAGCTCATGAAGAACCTCTTAGGA	661
S M I S V Y S Q R S Q L E L M K N L L G	213
GATGATGAATTAGCTGCGACAATCATCGATCCTTCAGAGCAGTTCTACTTTGCTAAAGGA	721
D D E L A A T I I D P S E Q F Y F A K G	233
CATATGGCTGCTGACGCGGACTTTGTGACAGTAGTTGAGCAGGACGCAACATACTATTAC	781
H M A A D A D F V T V V E Q D A T Y Y Y	253
ATCAACGCGTTGCCTCAATGGCAGGCCTTTAACAATGGAACTGGAAGTACTTGAATAC	841
I N A L P Q W Q A F N N G N W K Y L E Y	273
GACACCGTGACCTGGCTGAAAAACATGGCACTGACCTGACCGTCTACAGTGGTGGCTGG	901
D T R D L A E K H G T D L T V Y S G G W	293
GGGGTTCTAGAGCTTGAAGACATCAACGGAAACCCCGTTGAAATCTATCTTGGCCTCGCC	961
G V L E L E D I N G N P V E I Y L G L A	313
CAGGACAAAAAGTTGTCCCTGCTCCTGCATTAACATGGAAGGTGATCTATGACAAGGAC	1021
Q D K K V V P A P A L T W K V I Y E K D	333

Figura 6a

ACTAACCGAGCTGCTGCTATTGTTGGAATAAACCAACCCCCACATCACCACGGCACCAGAA	1081
T N R A A A I V G I N N P H I T T A P E	353
CCTCTTTGTACCGACATCTGCTCCAGCCTCACATGGCTGGACTTTGATTTTGGGGACCTT	1141
P L C T D I C S S L T W L D F D F G D L	373
GTCCATGGCTACACCTACTGCTGCTCTGTAGCTGATCTCAGGGCAGCCATTCCCAATGTT	1201
V H G Y T Y C C S V A D L R A A I P N V	393
CCAGATTTAGGAGACGTTGATATCTTAGACGAATAAaagatattcacgtactacaacccat	1261
P D L G D V D I L D E *	404
acaaagagagtgattgctgtacetttaactaaagggtctggacctggtaacatgcttatgt	1321
agttaatggtgtcgaggaattcatcaatcagagragaaactacttcaaagagggaataat	1381
aatcgcaatttttgttcattacaagtataatacttatcttattacaatttcgagtacgat	1441
tttaaaggatakatccacacacttatgcacaaagtgatcatcaagttatacagtcttcac	1501
taaaacataagcagtcattacggcatgtttcattcagaagttttcaagatattgattgcc	1561
attctcgatttcttgaaagatgtgcacacatgtggagaagaaatgtaaacatctttaa	1621
tcatactctggatatecagatattatgcacacaaaatgtcaagtcctcctgctgcttctt	1681
tggaaagatgtgcataatgcacgcacatgtaaccatgagattcacaaaatgtaatcatctc	1741
ttaatcaaaecctaatacagtcattcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1791

Figura 6b

1 EDCVWDNDVDYPEYPPILIDSSFQLVLPVLEGDQRITSVQSGSKLILACPGRGISALGSE
61 DAQATCLGGKLVEVDGKEWNIVELGCTKMASETIHRNLGQCGDQDLGIYEVIIGFDLPTTG
121 HFYELIRVCFDPANETTIFSENIVHGASIAAKDIDPGRPSFKTSTGFFSVSMISVYSQRS
181 QLELMKNLLGDDELAATIIDPSEQFYFAKGHMAPDADFVTVVEQDATYYYINALPQWQAF
241 NNGNWKYLEYDTRDLAEKHGTDLTVYSGGWGVLELEDINGNPVEIYLGLAQDKKVPAPAP
301 LTKKVIYEKDTNRAAAIVGINNPHITTAPEPLCTDICSSLTWLDFDFGDLVHGYTYCCSV
361 ADLRAAIPNVPD LGDVDILDE

Figura 7

GAGGACTGTGTCTGGGACAATGATGTAGAC

TATCCTGAGTATCCTCCTCTGATCCTGGATTTCATCCTTTTCAGCTGGTTCTGCCAGTGTTG 181

GAAGGAGACCAAAGGATAACCAGTGTCCAATCTGGGAGTAAGCTGATCTTGGCTTGTCTT 241

GGGAGGGGAATTTAGCCCTGGGGTCAGAGGATGCACAAGCCACTTGTCTTGGTGGCAAG 301

CTCGTCGAAGTCGATGGCAAAGAATGGAATATACTCGAACTCGGCTGCACAAAAATGGCA 361

TCTGAAACCATCCATAGAAACCTTGGACAATGTGGTGATCAAGACCTGGGAATTTACGAA 421

GTCATTGGTTTCGACCTTCCAACAACGGGACACTTCTATGAATTGATACGAGTTTGCTTT 481

GACCCGGCAAATGAGACCACTATTTTTCGAGAACATCGTTACGGAGCCAGCATCGCC 541

GCCAAAGACATTGACCCGGGTCGTCCATCTTTCAAACATCCACTGGGTCTTCAGTGTA 601

TCGATGATATCTGTCTATTCGCAAAGAAGTCAGCTGGAGCTCATGAAGAACCTCTTAGGA 661

GATGATGAATTAGCTGCGACAATCATCGATCCTTCAGAGCAGTTCTACTTTGCTAAAGGA 721

CATATGGCTCCTGACGCGGACTTTGTGACAGTAGTTGAGCAGGACGCAACATACTATTAC 781

ATCAACGCGTTGCCTCAATGGCAGGCCTTTAACAATGGAACTGGAAGTACTTGGAATAC 841

GACACCCGTGACCTGGCTGAAAAACATGGCACTGACCTGACCGTCTACAGTGGTGGCTGG 901

GGGGTTCTAGAGCTTGAAGACATCAACGGAAACCCCGTTGAAATCTATCTTGGCCTCGCC 961

CAGGACAAAAAAGTTGTCCCTGCTCCTGCATTAACATGGAAGGTGATCTATGAGAAGGAC 1021

ACTAACCGAGCTGCTGCTATTGTTGGAATAAACAACCCCCACATCACCACGGCACCAGAA 1081

CCTCTTTGTACCGACATCTGCTCCAGCCTCACATGGCTGGACTTTGATTTTGGGGACCTT 1141

GTCCATGGCTACACCTACTGCTGCTCTGTAGCTGATCTCAGGGCAGCCATTCCCAATGTT 1201

CCAGATTTAGGAGACGTTGATATCTTAGACGAATAA

Figura 8

cagtcagaactggtgaggagcaATGATAGGCCGGACCACTTTCATAGCTTTATTCGTAAAA	61
M I G R T T F I A L F V K	13
GTTCTGACTATTTGGAGCTTTACCAAAGGTGAGGACTGTGTCTGGGACAATGATGTAGAC	121
V L T I W S F T K G E D C V W D N D V D	33
TATCCTGAGTATCCTCCTCTGATCCTGGATTTCATCCTTTTCAGCTGGTTCTGCCAGTGTG	181
Y P E Y P P L I L D S S F Q L V L P V L	53
GAAGGAGACCAAAGGATAACCACTGTCCAATCTGGGAGTAAGCTGATCTTGGCTTGTCT	241
E G D Q R I T S V Q S G S K L I L A C P	73
GGGAGGGGAATTTTCAGCCCTGGGGTTCAGAGGATGCACAAGCCACTTGTCTTGGTGGCAAG	301
G R G I S A L G S E D A Q A T C L G G K	93
CTCGTCGAAGTCGATGGCAAAGAATGGAATATAGTCGAACCTCGGCTGCACAAAAATGGCA	361
L V E V D G K E W N I V E L G C T K M A	113
TCTGAAACCATCCATAGAAACCTTGGACAATGTGGTGATCAAGACCTGGGAATTTACGAA	421
S E T I H R N L G Q C G D Q D L G I Y E	133
GTCATTGGTTTCGACCTTCCAACAACGGGACACTTCTATGAATTGATACGAGTTTGCTTT	481
V I G F D L P T T G H F Y E L I R V C F	153
GACCCGGCAAATGAGACCACTATTTTTTCCGAGAACATCGTTCACGGAGCCAGCATCGCC	541
D P A N E T T I F S E N I V H G A S I A	173
GCCAAAGACATTGACCCGGGTCGTCCATCTTTCAAACATCCACTGGGTTCTTCAGTGTA	601
A K D I D P G R P S F K T S T G F F S V	193
TCGATGATATCTGTCTATTTCGCAAAGAAGTCAGCTGGAGCTCATGAAGAACCTCTTAGGA	661
S M I S V Y S Q R S Q L E L M K N L L G	213
GATGATGAATTAGCTGCGACAATCATCGATCCTTCAGAGCAGTTCTACTTTGCTAAAGGA	721
D D E L A A T I I D P S E Q F Y F A K G	233
CATATGGCTCCTGACGCGGACTTTGTGACAGTAGTTGAGCAGGACGCAACATACTATTAC	781
H M A P D A D F V T V V E Q D A T Y Y Y	253
ATCAACGCGTTGCCTCAATGGCAGGCTTTAACAATGGAACTGGAAGTACTTGAATAC	841
I N A L P Q W Q A F N N G N W K Y L E Y	273
GACACCCGTGACCTGGCTGAAAAACATGGCACTGACCTGACCGTCTACAGTGGTGGCTGG	901
D T R D L A E K H G T D L T V Y S G G W	293
GGGGTTCTAGAGCTTGAAGACATCAACGGAAACCCGTTGAAATCTATCTTGGCCTCGCC	961
G V L E L E D I N G N P V E I Y L G L A	313
CAGGACAAAAAGTTGTCCCTGCTCCTGCATTAACATGGAAGGTGATCTATGAGAAGGAC	1021
Q D K K V V P A P A L T W K V I Y E K D	333

Figura 9a

ACTAACCGAGCTGCTGCTATTGTTGGAATAAACAACCCCCACATCACCACGGCACCAGAA	1081
T N R A A A I V G I N N P H I T T A P E	353
CCTCTTTGTACCGACATCTGCTCCAGCCTCACATGGCTGGACTTTGATTTTGGGGACCTT	1141
P L C T D I C S S L T W L D F D F G D L	373
GTCCATGGCTACACCTACTGCTGCTCTGTAGCTGATCTCAGGGCAGCCATTCCCAATGTT	1201
V H G Y T Y C C S V A D L R A A I P N V	393
CCAGATTTAGGAGACGTTGATATCTTAGACGAATAAaagatattcacgtactacaaccat	1261
P D L G D V D I L D E *	404
acaaagagagtgattgctgtacctttaactaaaggtctggacotggtaacatgcttatgt	1321
agttaatgggtgtcgaggaattcatcaatcagagragaaactacttcaaagagggaaaaatt	1381
aatcgcaatttttgttcattacaagtataatacttattattacaatttcgagtagcat	1441
tttaaaggatakatccacacacttatgcacaaagtgatcatcaagttatacagtcttcat	1501
taaaacataagcagtcattacggcatgtttcattcagaagttttcaagatattgattgcc	1561
attctcgattttcttgaaagatgtgcacacatgtggagaagaaatgtaaacatcttaaaat	1621
tcatactctggatatccagatattatgcacacaaaatgtcaagtcctcctgcctgcttctt	1681
tggaaagatgtgcataatgcacgcacatgtaacatgagattcacaaaatgtaatcatctc	1741
ttaatcaaaacctaatacagtcattcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1791

Figura 9b

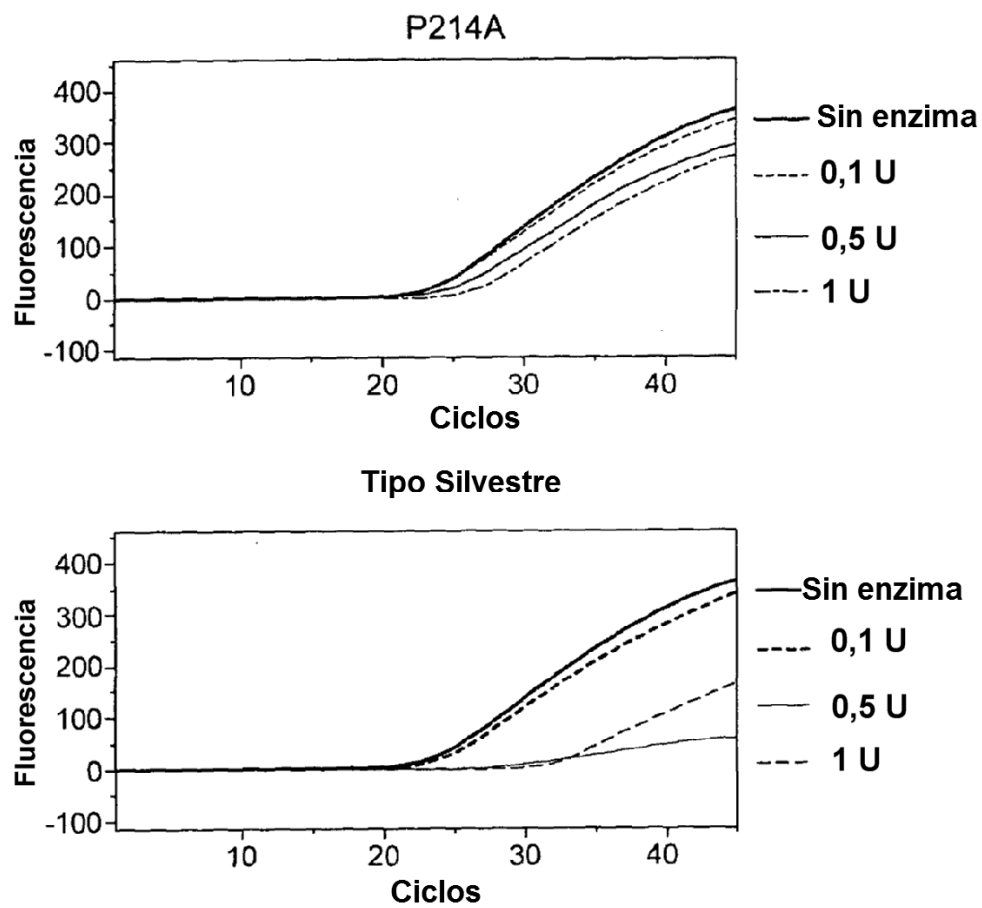


Figura 10

Figura 11

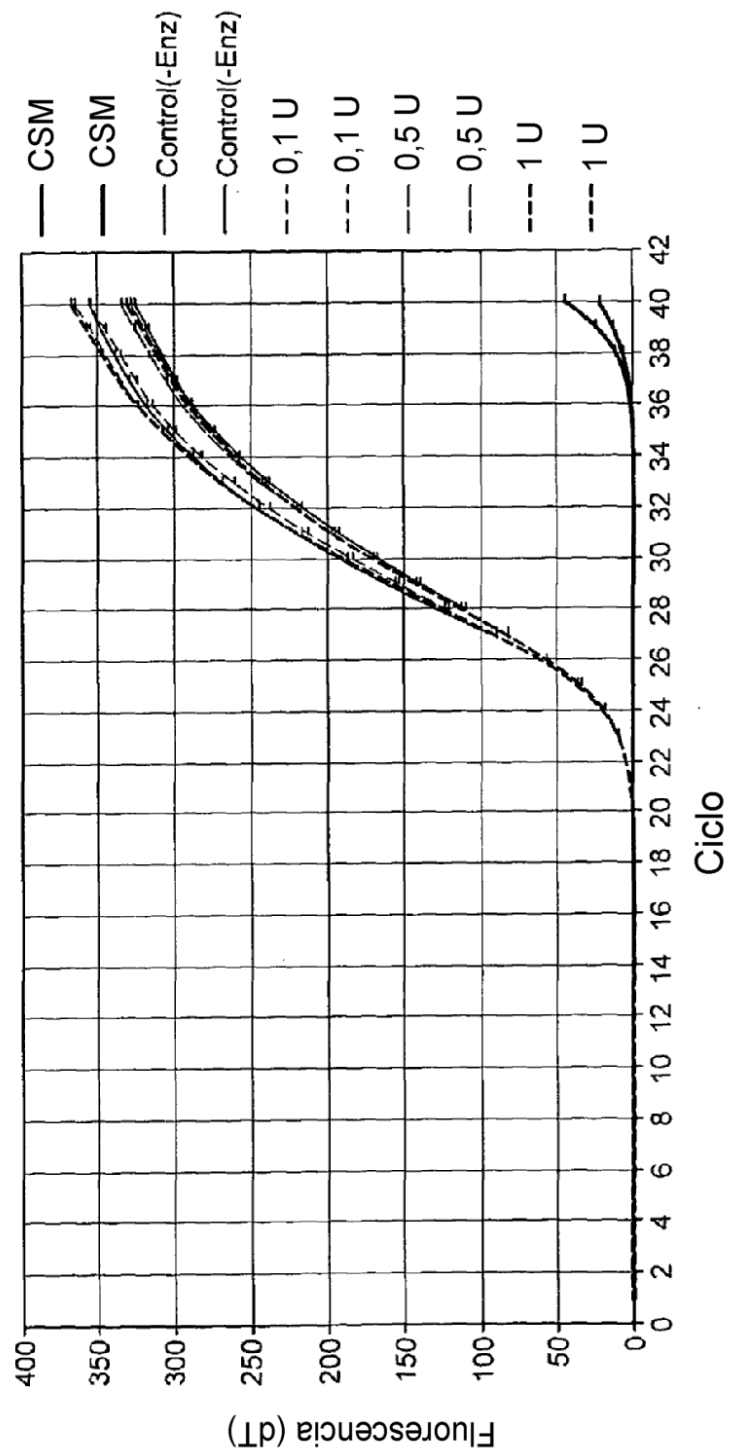


Figura 12

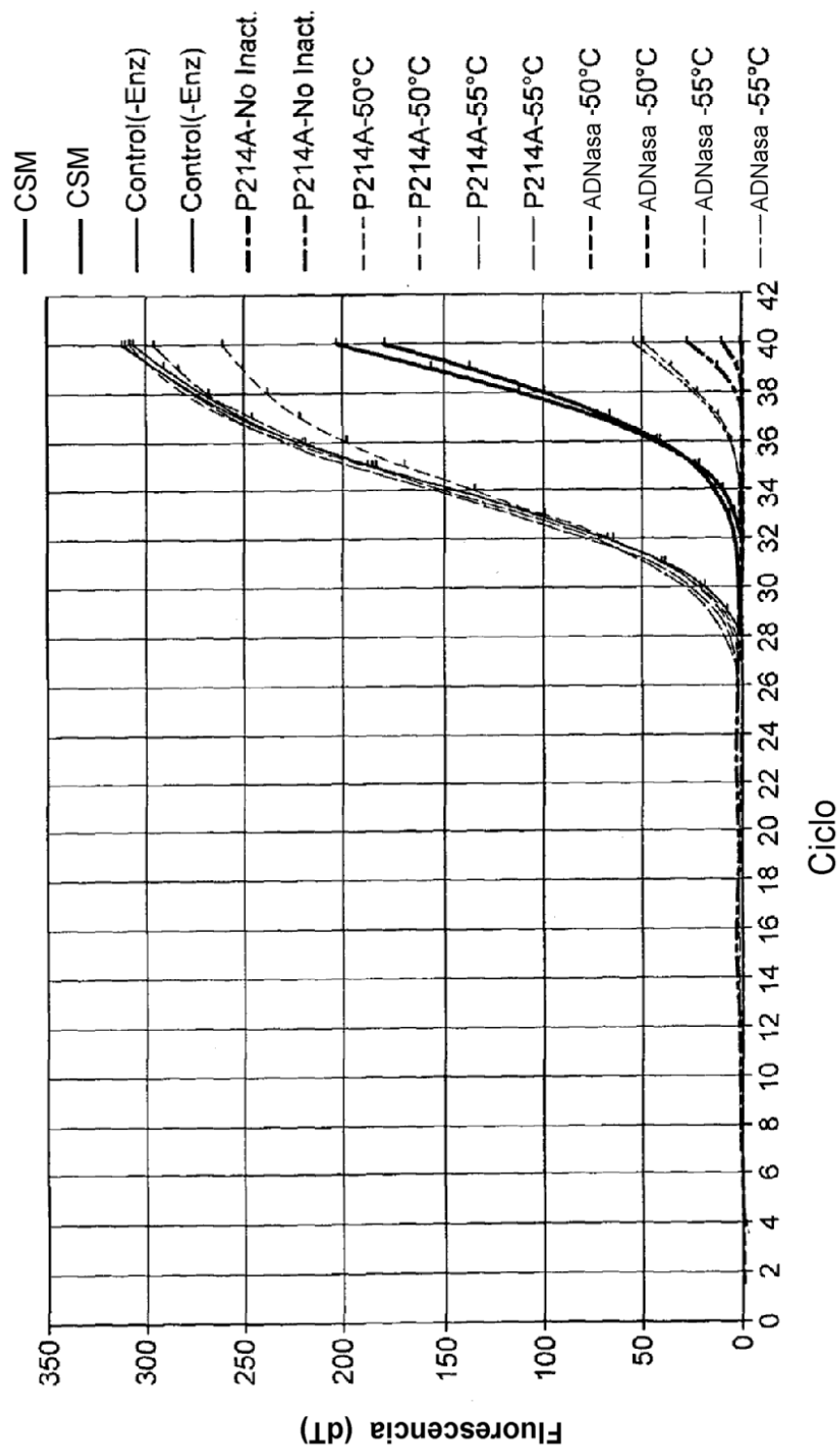


Figura 13

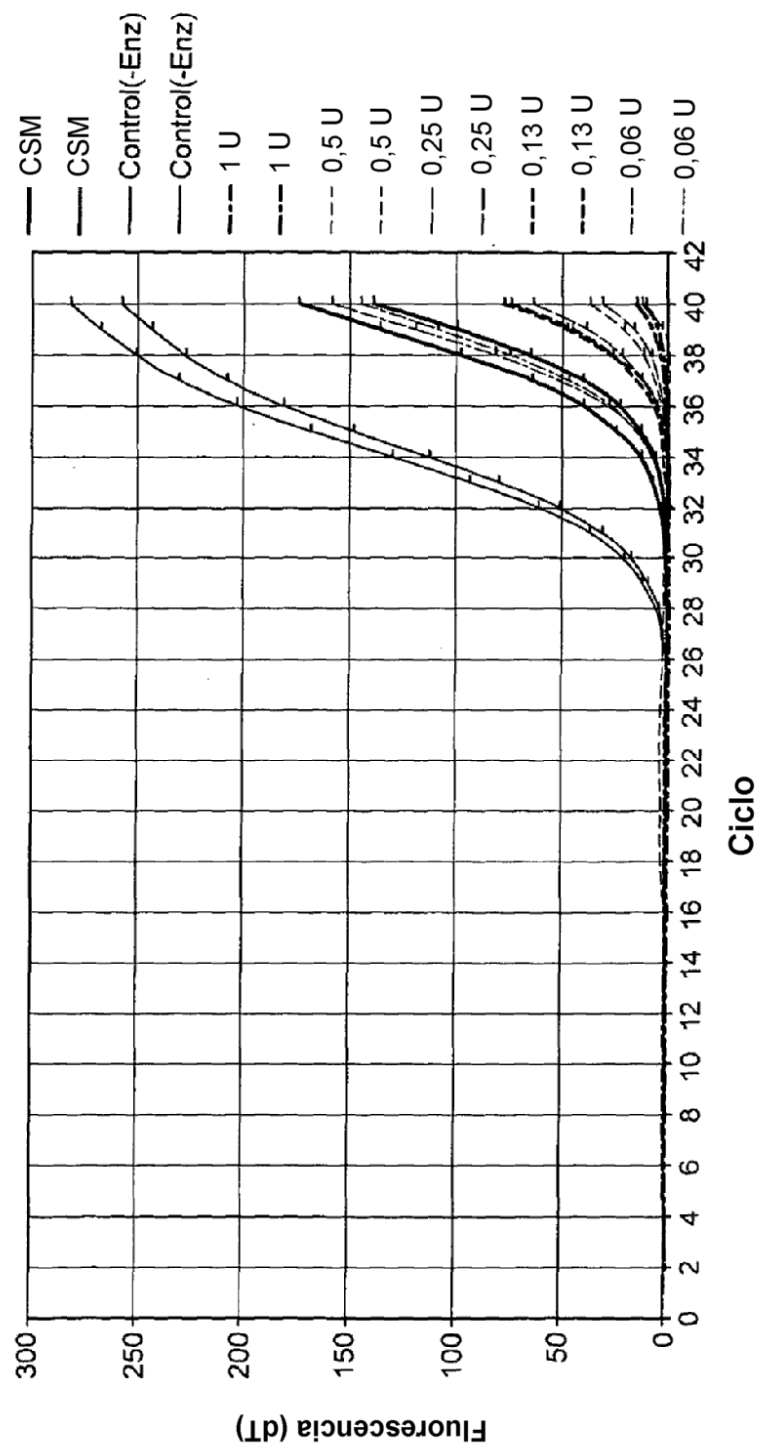


Figura 14

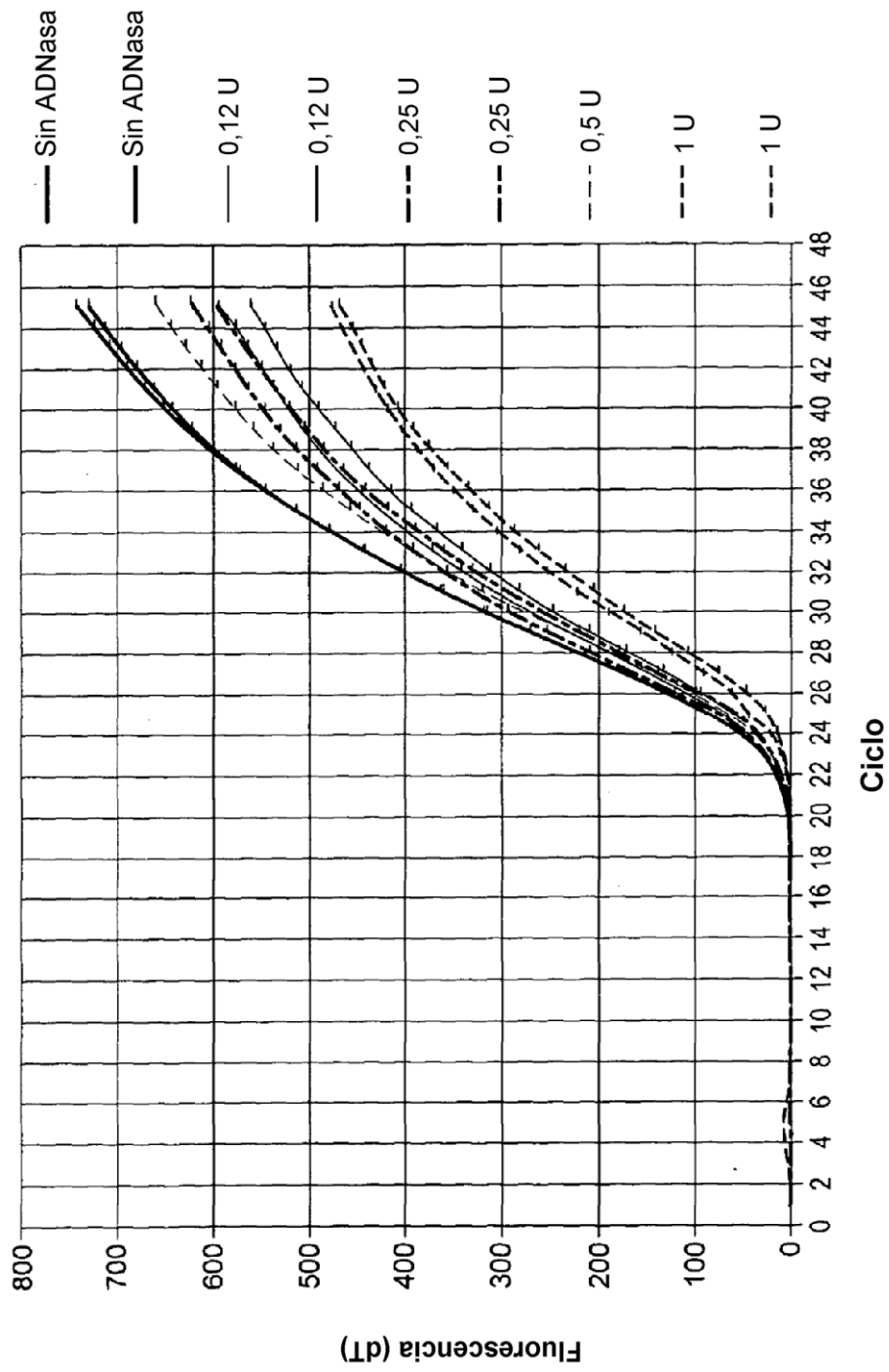


Figura 15

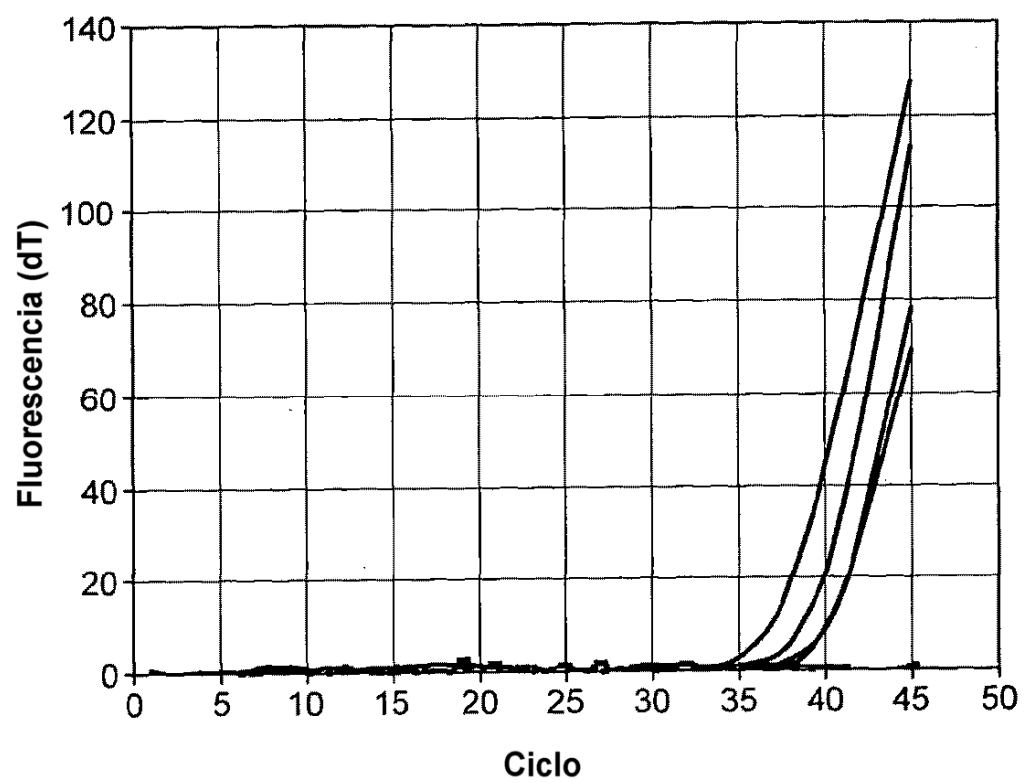


Figura 16