

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 692**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011** **E 11728586 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016** **EP 2582802**

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

30 Prioridad:

18.06.2010 US 356279 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

REICHERT, FRED L.;
BAUER, KEITH A.;
MYERS, THOMAS W.;
SCHOENBRUNNER, NANCY J. y
SAN FILIPPO, JOSEPH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 692 T3

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

DESCRIPCIÓN

ADN polimerasas con discriminación incrementada de no correspondencia 3'

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

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

El patrón de pliegue global de las ADN polimerasas es similar al de la mano derecha humana y contiene tres subdominios diferentes de palma, dedos y pulgar (ver Beese et al., Science 260:352-355, 1993); Patel et al., Biochemistry 34:5351-5363, 1995). Aunque la estructura de los subdominios de dedos y pulgar varían mucho entre polimerasas que difieren en el tamaño y en las funciones celulares, los subdominios de palma catalíticos son todos superponibles. Por ejemplo, el motivo A, que interactúa con el dNTP entrante y estabiliza el estado de transición durante la catálisis química, es superponible con una desviación promedio de aproximadamente 1 Å entre la pol α de mamíferos y las ADN polimerasas de la familia procariótica de pol I (Wang et al., Cell 89:1087-1099, 1997). El motivo A se inicia estructuralmente en una cadena β antiparalela que contiene predominantemente residuos hidrofóbicos y continúa a una hélice α. La secuencia de aminoácidos primaria de los sitios activos de la ADN polimerasa se encuentra excepcionalmente conservada. En el caso del motivo A, por ejemplo, la secuencia DYSQIELR (SEC ID nº 28) se conserva en las polimerasas de organismos separados por muchos millones de años de evolución, entre ellos, por ejemplo, *Thermus aquaticus*, *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli*.

Además, de estar bien conservado, el sitio activo de las ADN polimerasas también ha demostrado ser relativamente mutable, capaz de ajustarse a determinadas sustituciones de aminoácidos sin reducir significativamente la actividad de la ADN polimerasa (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.602.695). Dichas ADN polimerasas mutantes puede ofrecer diversas ventajas selectivas en, por ejemplo, aplicaciones diagnósticas y de investigación que comprenden reacciones de síntesis de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el documento nº WO 2008/046612 da a conocer la ADN polimerasa Z05 D580G con una tasa mejorada de extensión de los ácidos nucleicos y/o una eficiencia mejorada de transcripción inversa. De esta manera, existe una necesidad en la técnica de identificar las posiciones de aminoácidos que pueden mutarse para rendir actividades mejoradas de polimerasa. La presente invención, tal como se proporciona en la presente memoria, satisface ésta y otras necesidades.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

En la presente memoria se proporcionan ADN polimerasas que presentan una discriminación incrementada de no correspondencias 3' en comparación con una polimerasa de control no modificada correspondiente, y métodos de preparación y utilización de estas ADN polimerasas. En algunas realizaciones, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoactiva. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa de la presente invención se deriva de una especie de *Thermus*. Una ADN polimerasa que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 o a SEC ID nº 2 y que presenta una actividad de discriminación incrementada de las no correspondencias 3' en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que la ADN polimerasa comprende un motivo en el dominio de polimerasa que

comprende A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-F-D-E-L, en la que X₁₀ es A, G, K o R (SEC ID nº 10), en el que la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido X₁₀ de la ADN polimerasa de control es E.

- 5 En algunas realizaciones, la ADN polimerasa comprende además un motivo que comprende T-G-R-L-S-S-X₇-X₈-P-N-L-Q-N, en la que X₇ es Ser (S) o Thr (T), y X₈ es cualquier aminoácido diferente de D o E (SEC ID nº 27). En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición X₈ se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunas realizaciones, la polimerasa presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95% respecto a SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, la
- 10 ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 580 de SEC ID nº 1 se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En otras realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*. En determinadas realizaciones X₁₀ es K.

- 15 También se da a conocer que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermotoga*. Según la invención se ha descubierto que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de SEC ID nº 1 puede mutarse respecto al aminoácido nativo en esa posición para producir un enzima que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' respecto a una polimerasa de control no modificada correspondiente. En las ADN polimerasas derivadas de una especie de *Thermus*, el aminoácido nativo correspondiente a la posición 493 de SEC ID nº 1 es E. En las ADN polimerasas derivadas de una especie de *Thermotoga*, el aminoácido nativo
- 20 correspondiente a la posición 493 de SEC ID nº 1 es S. En las ADN polimerasas derivadas de otras especies no *Thermus*, no *Thermotoga*, el aminoácido correspondiente a la posición 493 de SEC ID nº 1 puede ser un aminoácido diferente de E o S, por ejemplo A o G. Ver la figura 1.

- 25 Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de E, S, A o G, y la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 es E, S, A o G. Por ejemplo, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, K, R o H. Sin embargo, se ha descubierto además que la inserción de A o G (el aminoácido nativo en algunas especies no *Thermus* no
- 30 *Thermotoga*) en lugar de E en la posición 493 de las polimerasas de *Thermus* también incrementa la discriminación de las no correspondencias 3'. De esta manera, se da a conocer que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermus*, y el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de E, y la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 493 de la
- 35 SEC ID nº 1 es E. Por ejemplo, en el caso de que la ADN polimerasa se derive de una especie de *Thermus*, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 puede seleccionarse de entre S, A, G, V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, K, R o H. Se da a conocer además que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre S, A, Q, G, K o R. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre A, G, K o R. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la
- 40 SEC ID nº 1 es K.

- 45 Se da a conocer además que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermus* y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 es un aminoácido que presenta una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo N, Q, H, S, T o Y), una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo G, A, L, M, W, P, F, C, V o I) o una cadena lateral con carga positiva polar (por ejemplo R o K) a pH neutro. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 que presenta una cadena lateral sin carga no polar es A o G. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 que
- 50 presenta una cadena lateral con carga positiva polar es R o K. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 que presenta una cadena lateral con carga positiva polar es K.

- Además, se da a conocer que otros aminoácidos, situados próximos al aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 también pueden mutarse para producir un enzima que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' respecto a una polimerasa de control no modificada correspondiente. Por
- 55 ejemplo, las mutaciones en los aminoácidos correspondiente a las posiciones 488 y/o 497 de la SEC ID nº 1 también producen un enzima que presenta una discriminación de no correspondencias 3' incrementada respecto a una polimerasa de control no modificada correspondiente.

- 60 Se da a conocer además que la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende:

A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L, en la que:

X₆ es S, G, A, D, F, K, C, T o Y,

X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de E,

- 65 X₁₃ es F, A, G, S, T, Y, D o K (SEC ID nº 8).

Se da a conocer además que X_{10} se selecciona de entre L, M, W, P, T, F, Y, C, N, D, V, I, R, K, Q, H, S, A o G.

Se da a conocer además que X_{10} se selecciona de entre R, K, A o G (SEC ID nº 49).

- 5 Se da a conocer además que la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende:

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L- X_{10} -R-V-L-F-D-E-L, en la que:
 X_{10} es cualquier aminoácido diferente de E (SEC ID nº 9).

- 10 Se da a conocer además que X_{10} se selecciona de entre L, M, W, P, T, F, Y, C, N, D, V, I, R, K, Q, H, S, A o G.

Se da a conocer además que X_{10} se selecciona de entre R, K, A o G (SEC ID nº 50).

- 15 En algunas realizaciones, la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende:

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L- X_{10} -R-V-L-F-D-E-L, en la que:
 X_{10} es A, G, K o R (SEC ID nº 10).

- 20 En algunas realizaciones de dicha ADN polimerasa, X_{10} se selecciona de entre A o G.

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3' comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende:

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L- X_{10} -R-V-L-F-D-E-L, en la que:
 X_{10} es K (SEC ID nº 11).

- 25 En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de D o E. En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de D. En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunas realizaciones, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de la SEC ID nº 1 es G.

En algunas realizaciones, la ADN polimerasa según la invención comprende además un motivo que comprende:

- 35 T-G-R-L-S-S- X_7 - X_8 -P-N-L-Q-N, en el que:
 X_7 es Ser (S) o Thr (T), y
 X_8 es cualquier aminoácido diferente de D o E (SEC ID nº 27).

- 40 En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición X_8 se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K (SEC ID nº 51).

Se da a conocer además que la ADN polimerasa comprende además una mutación en uno o más aminoácidos correspondiente a una posición seleccionada de entre 488 y/o 497 de la SEC ID nº 1. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 488 de SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de S. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 488 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, E, T, C, N, Q, D, Y, K, R o H. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 488 de la SEC ID nº 1 es G, A, D, F, K, C, T o Y. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de la SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de F o Y. Se da a conocer además que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre R, V, L, I, M, W, P, T, C, N, D, E, S, A, G, K, E o H. Se da a conocer además que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermus* y el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de la SEC ID nº 1 es cualquier aminoácido diferente de F. De esta manera, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 497 de la SEC ID nº 1 es A, G, S, T, Y, D o K.

- 55 Diversas ADN polimerasas pueden mutarse según la presente invención. Resultan particularmente adecuadas las polimerasas termoestables, incluyendo las polimerasas termoestables de tipo salvaje o naturales de diversas especies de bacterias termofílicas, así como polimerasas termoestables sintéticas derivadas de dichos enzimas de tipo salvaje o naturales mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos, u otra modificación. Entre las formas no modificadas ejemplares de polimerasa se incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa CS5 (SEC ID nº 29), CS6 (SEC ID nº 30) o Z05 (SEC ID nº 1) o una ADN polimerasa funcional que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos respecto a dicha ADN polimerasa de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%. Entre otras polimerasas no modificadas se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de cualquiera de las especies de bacterias termofílicas siguientes (o de una ADN polimerasa funcional que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a dicha polimerasa): *Thermotoga maritima* (SEC ID nº 38),

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

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

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

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

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

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

Se da a conocer además que la ADN polimerasa presenta una identidad de secuencias de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a la SEC ID nº 1. Se da a conocer además que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05) (es decir, SEC ID nº 1), excepto en que el aminoácido en la posición 493 es cualquier aminoácido diferente de E o S. Se da a conocer además que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y que el aminoácido en la posición 493 es cualquier aminoácido diferente de E. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 493 se selecciona de entre V, L, I, M, F, W, P, T, C, Y, N, Q, D, K, R, S, A, G o H. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 493 es G, A, K o R. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 493 es K. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 que comprende además una sustitución en la posición 580 y el aminoácido en la posición 580 es cualquier aminoácido diferente de D o E. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 es cualquier aminoácido diferente de D. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunas realizaciones, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 es G.

La polimerasa mutante o mejorada puede incluir otras modificaciones no de sustitución. Una de estas modificaciones es una modificación covalente térmicamente reversible que inactiva el enzima pero que se revierte para activar el enzima con la incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura utilizada típicamente para la extensión de polinucleótidos. Los reactivos ejemplares para dichas modificaciones térmicamente reversibles se describen en las patentes US nº 5.773, 258 y 5.677.152.

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

de referencia (por ejemplo una polimerasa no modificada o natural), durante una unidad de tiempo preseleccionada, tal como se indica en la presente memoria. Las polimerasas con capacidad incrementada de discriminación de no correspondencias 3' no amplificarán la secuencia de tipo salvaje al ponerlas en contacto con un cebador que sea perfectamente correspondiente con un alelo mutante, o requerirán un número mayor de ciclos de PCR para amplificar la secuencia de tipo salvaje utilizando el cebador mutante específico de alelo (es decir, mostrarán un valor de Cp más alto), en comparación con una polimerasa no modificada o natural.

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

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

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

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

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

DEFINICIONES

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

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

Un "aminoácido" se refiere a cualquier unidad monomérica que puede incorporarse en un péptido, polipéptido o proteína. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye los veinte alfa-aminoácidos naturales o genéticamente codificados. alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), glutamina (Gln o Q), ácido glutámico (Glu o E), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V). En los casos en que los "X" residuos no están definidos, estos deben definirse como "cualquier aminoácido". Las estructuras de estos veinte aminoácidos naturales se muestran en, por ejemplo, Stryer et al., Biochemistry, 5a ed., Freeman and Company, 2002. Algunos aminoácidos adicionales, tales como la selenocisteína y la pirrolisina, también pueden encontrarse

codificados genéticamente (Stadtman, "Selenocysteine", Annu. Rev. Biochem. 65:83-100, 1996, e Ibba et al., "Genetic code: introducing pyrrolysine", Curr. Biol. 12(13):R464-R466, 1996). El término "aminoácido" incluye además aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados (por ejemplo que presentan cadenas laterales y/o esqueletos modificados) y análogos de aminoácidos. Ver, por ejemplo, Zhang et al., "Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(24):8882-8887, 2004; Anderson et al., "An expanded genetic code with a functional quadruplet codon", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(20):7566-7571, 2004; Ikeda et al., "Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo", Protein Eng. Des. Sel. 16(9):699-706, 2003; Chin et al., "An Expanded Eukaryotic Genetic Code", Science 301(5635):964-967, 2003; James et al. "Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues", Protein Eng. Des. Sel. 14(12):983-991, 2001; Kohrer et al., "Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(25):14310-14315, 2001; Bacher et al., "Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue", J. Bacteriol. 183(18):5414-5425, 2001; Hamano-Takaku et al., "A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrine More Efficiently than Tyrosine", J. Biol. Chem. 275(51):40324-40328, 2000, y Budisa et al., "Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids," Protein Sci. 10(7):1281-1292.

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

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

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

La expresión "forma no modificada", en el contexto de una polimerasa mutante, es una expresión utilizada en la presente memoria con el fin de definir una ADN polimerasa mutante de la presente invención: la expresión "forma no modificada" se refiere a una ADN polimerasa funcional que presenta la secuencia de aminoácidos de la polimerasa mutante excepto en una o más posiciones de aminoácidos especificadas como caracterizadoras de la polimerasa mutante. De esta manera, la referencia a una ADN polimerasa mutante en términos de (a) su forma no modificada y (b) una o más sustituciones de aminoácidos especificadas, se refiere a que, con la excepción de la sustitución o sustituciones de aminoácidos especificadas, la polimerasa mutante presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la forma no modificada en el motivo especificado. La "polimerasa no modificada" (y por lo tanto también la forma modificada que presenta una discriminación incrementada de no correspondencias 3') puede contener mutaciones adicionales para proporcionar la funcionalidad deseada, por ejemplo una incorporación mejorada de dideoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, análogos de ribonucleótido, nucleótidos marcados con pigmento, modulación de la actividad de nucleasa 5', modulación de la actividad de nucleasa (o correctora de errores) 3', o similar. De acuerdo con lo anterior, al llevar a cabo la presente invención tal como se describe en la presente memoria, la forma no modificada de una ADN polimerasa se encuentra predeterminada. La forma no modificada de una ADN polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa de tipo salvaje y/o una ADN polimerasa natural, o una ADN polimerasa que ya ha sido modificada deliberadamente. Una forma no modificada de la polimerasa preferentemente es una ADN polimerasa termoestable, tal como las ADN polimerasas de diversas bacterias termofílicas, así como variantes funcionales de las mismas que presentan identidad de secuencia respecto a una polimerasa termoestable de tipo salvaje o natural. Entre dichas variantes pueden incluirse, por ejemplo, ADN polimerasas quiméricas tales como, por ejemplo, las ADN polimerasas quiméricas indicadas en la patente US nº 6.228.628 y en la solicitud de patente US publicada nº 2004/0005599. En determinadas realizaciones, la forma no modificada de una polimerasa presenta actividad de transcriptasa inversa (TI).

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

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

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

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

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

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

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se encuentre en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o un intensificador se encuentra operablemente

ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre posicionado de manera que facilite la traducción.

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

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

20 Algunos vectores de expresión adicionalmente contienen elementos de secuencia contiguos al ADN insertado que incrementan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula de proteína. De esta manera, pueden sintetizarse rápidamente muchas moléculas de ARNm y del polipéptido codificado por el ADN insertado.

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

30 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que puede ser correspondiente de un ácido nucleico de ribosa (ARN) o un polímero ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo de los mismos. Lo anterior incluye polímeros de nucleótidos, tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo química o bioquímicamente modificadas) de las mismas, y polímeros mixtos (por ejemplo subunidades de tanto ARN como ADN). Entre las modificaciones ejemplares se incluyen la metilación, la sustitución de uno o más nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleótidas, tales como enlaces sin carga (por ejemplo fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), fracciones colgantes (por ejemplo polipéptidos), intercalantes (por ejemplo acridina, psoralén y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo ácidos nucleicos alfa-anoméricos y similares). También se encuentran incluidas moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad de unirse a una secuencia designada, mediante enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros nucleótidos se encuentran unidos mediante enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo ácidos péptido-nucleicos tal como se indica en Nielsen et al. (Science 254:1497-1500, 1991). Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desnudo, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de cadena sencilla, de doble cadena o de triple cadena, y no se encuentra limitado a ninguna longitud en particular. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

50 El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos unidades monoméricas de ácidos nucleicos (por ejemplo nucleótidos). Un oligonucleótido típicamente incluye entre aproximadamente seis y aproximadamente 175 unidades monoméricas de ácidos nucleicos, más típicamente entre aproximadamente ocho y aproximadamente 100 unidades monoméricas de ácidos nucleicos, y todavía más típicamente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 unidades monoméricas de ácidos nucleicos (por ejemplo aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o más unidades monoméricas de ácidos nucleicos). El tamaño exacto de un oligonucleótido depende de muchos factores, incluyendo la función última o utilización del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier método adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método tal como el método de fosfotriéster de Narang et al. (Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979), el método de fosfodiéster de Brown et al. (Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979), el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al. (Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981); el método de triéster de Matteucci et al. (J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981); los métodos de síntesis automatizada, o el método de soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, u otros métodos conocidos por el experto en la materia.

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

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

El término "FRET" o "transferencia de energía de resonancia fluorescente" o "transferencia de energía de resonancia de Foerster" se refiere a una transferencia de energía entre por lo menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado inhibidor). El donante típicamente transfiere la energía al aceptor cuando el donante es excitado por radiación lumínica de una longitud de onda adecuada. El aceptor típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. En el caso de que el aceptor sea un inhibidor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma que no es luz. Que un fluoróforo particular actúe como donante o aceptor depende de las propiedades del otro elemento de la pareja FRET. Entre las parejas de donante-aceptor utilizadas comúnmente se incluyen la pareja FAM-TAMRA. Son inhibidores utilizados comúnmente, DABCILo y TAMRA. Entre los inhibidores oscuros utilizados comúnmente se incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

El término "convencional" o "natural" en referencia a bases de ácidos nucleicos, nucleósidos trifosfato o nucleótidos se refiere a aquellos presentes naturalmente en el polinucleótido que se describe (es decir, para el ADN son dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Además, se utilizan frecuentemente dITP y 7-deaza-dGTP en lugar de dGTP, y 7-deaza-dATP puede utilizarse en lugar de dATP en reacciones de síntesis de ADN in vitro, tales como la secuenciación. Colectivamente pueden denominarse dNTP.

La expresión "no convencional" o "modificado" en referencia a una base de ácidos nucleicos, nucleósido o nucleótido incluye las modificaciones, derivaciones o análogos de bases convencionales, nucleósidos o nucleótidos que se observan naturalmente en un polinucleótido particular. Determinados nucleótidos no convencionales se encuentran

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de identidad de secuencias" se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa una base de ácidos nucleicos o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

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

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

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

Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera de entre varias posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo que consiste de entre 20 y 600, habitualmente de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200, más habitualmente de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras la alineación óptima de las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1970), mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988), mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (por ejemplo GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

Los algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales han sido descritos en Altschul et al. (Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977), y en Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990), respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST se encuentra disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar las parejas de secuencias de alta puntuación (PSAP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta que corresponden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo estando alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., *supra*). Estos resultados iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas de PAP más largas que las contengan. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de premio para una pareja de residuos correspondientes, siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no correspondientes, siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene en el caso de que: la puntuación acumulada de alineación caiga en una cantidad X respecto al valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada vaya a cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuaciones negativas, o se alcance el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra de 3 y un valor esperado (E) de 10, y la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) alineaciones (B) de 50, valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza además un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produzca por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia en el caso de que la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo y el ácido nucleico de referencia sea inferior a aproximadamente 0,2, típicamente inferior a aproximadamente 0,01, y más típicamente inferior a aproximadamente 0,001.

La expresión "discriminación de no correspondencias" se refiere a la capacidad de un biocatalizador (por ejemplo un enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similar) de distinguir una secuencia totalmente complementaria de una secuencia que contiene no correspondencias, durante la extensión de un ácido nucleico (por ejemplo un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente del molde mediante la unión (por ejemplo covalentemente) de uno o más nucleótidos al ácido nucleico. La expresión "discriminación de no correspondencias 3'" se refiere a la capacidad de un biocatalizador de distinguir una secuencia totalmente complementaria de una secuencia (casi complementaria) que contiene no correspondencias en la que el ácido nucleico que debe extenderse (por ejemplo un cebador u otro oligonucleótido) presenta una no correspondencia en el extremo 3'-terminal del ácido nucleico en comparación con el molde con el que se hibrida el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que debe extenderse comprende una no correspondencia en el extremo 3' respecto a la secuencia totalmente complementaria. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que debe extenderse comprende una no correspondencia en la penúltima posición (N-1) 3' y/o en la posición N-2 respecto a la secuencia totalmente complementaria.

La expresión "valor Cp" o valor de "punto de cruce" se refiere a un valor que permite la cuantificación de los ácidos nucleicos diana de entrada. El valor Cp puede determinarse según el método de máximo de segunda derivada (Van Luu-The et al., "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction", BioTechniques, vol. 38, nº 2, febrero de 2005, páginas 287-293). En el método de

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del dominio de polimerasa de ADN polimerasas ejemplares de diversas especies de bacterias: *Thermus* species Z05 (Z05) (SEC ID nº 12), *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID nº 13), *Thermus filiformis* (Tfi) (SEC ID nº 14), *Thermus flavus* (Tfl) (SEC ID nº 15), *Thermus* especie Sps17 (Sps17) (SEC ID nº 16), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID nº 17), *Thermus caldophilus* (Tca) (SEC ID nº 18), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID nº 19), *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEC ID nº 20), *Thermosipho africanus* (Taf) (SEC ID nº 21), *Deinococcus radiodurans* (Dra) (SEC ID nº 23), *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (SEC ID nº 24) y *Bacillus caldotenax* (Bca) (SEC ID nº 25). Además, las regiones polipeptídicas mostradas comprenden el motivo de aminoácidos A-G-X₁-X₂-F-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L (SEC ID nº 26), las posiciones variables del cual se definen adicionalmente en la presente memoria. Este motivo se subraya en negrita para cada secuencia de polimerasa. Las posiciones de aminoácidos que pueden mutar según la presente invención se indican con un asterisco (*).

La figura 2 proporciona las identidades de secuencia entre los enzimas ADN polimerasa I siguientes: ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05), ADN polimerasa Z05 (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi); ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl); ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17); ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth); ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca); ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra); ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma); ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne); ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf); ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst) y ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca). (A) identidades de secuencia a lo largo del enzima polimerasa I entero (correspondiente a los aminoácidos 1 a 834 de Z05), y (B) identidades de secuencia a lo largo del subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420 a 834 de Z05.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

Polimerasa de la invención

Se dan a conocer ADN polimerasas que pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

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

X₆ es Ser (S), Gly (G), Ala (A), Asp (D), Phe (F), Lys (K), Cys (C), Thr (T) o Tyr (Y),

X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E), y

X₁₃ es Phe (F), Ala (A), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y), Asp (D) o Lys (K) (SEC ID nº 8).

En la presente memoria, X₁₀ se selecciona de entre L, M, W, P, T, F, Y, C, N, D, V, I, R, K, Q, H, S, A o G. Se da a conocer además que X₁₀ se selecciona de entre R, K, A o G (SEC ID nº 49).

Se dan a conocer además ADN polimerasas derivadas de una especie del género *Thermus* que pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-X₁₀-Arg-Val-Leu-Phe-Asp-Glu-Leu (también denominado en el código de una letra: A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-F-D-E-L), en el que X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E) (SEC ID nº 9).

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la invención derivadas de una especie del género *Thermus* pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-X₁₀-Arg-Val-Leu-Phe-Asp-Glu-Leu (también denominado en el código de una letra: A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-F-D-E-L), en el que: X₁₀ es Ala (A), Gly (G), Lys (K) o Arg (R) (SEC ID nº 10).

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la invención derivadas de una especie del género *Thermus* pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

Ala-Gly-His-Pro-Phe-Asn-Leu-Asn-Ser-Arg-Asp-Gln-Leu-X₁₀-Arg-Val-Leu-Phe-Asp-Glu-Leu (también denominado en el código de una letra: A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-F-D-E-L), en el que: X₁₀ es Lys (K) (SEC ID nº 11).

Además, se da a conocer que las ADN polimerasas pueden comprender sustituciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo en las posiciones X₆ y X₁₃ del motivo nativo (SEC ID nº 26). Las sustituciones adicionales en las posiciones X₆ y X₁₃ también pueden resultar en una discriminación incrementada de no correspondencias 3'. De esta manera, se dan a conocer ADN polimerasas que pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

Ala-Gly-X₁-X₂-Phe-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en la presente memoria con el código de una letra: A-G-X₁-X₂-F-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L), en el que:
X₁ es His (H), Glu (E) o Gln (Q),
X₂ es Pro (P), Thr (T) o Glu (E),
X₃ es Asn (N) o His (H),
X₄ es Leu (L) o Ile (I),
X₅ es Asn (N) o Arg (R),
X₆ es cualquier aminoácido,
X₇ es Arg (R), Pro (P) o Ser (S),
X₈ es Asp (D), Lys (K) o Thr (T),
X₉ es Leu (L) o Val (V),
X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E), Ser (S), Ala (A) o Gly (G),
X₁₁ es Arg (R), Asn (N), Tyr (Y), Thr (T) o Val (V),
X₁₂ es Val (V) o Ile (I),
X₁₃ es cualquier aminoácido,
X₁₄ es Asp (D) o Glu (E), y
X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID nº 42).

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

Ala-Gly-X₁-Pro-Phe-Asn-X₄-Asn-X₆-X₇-X₈-Gln-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Leu (también denominado en la presente memoria con el código de una letra: A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L), en el que:
X₁ es His (H) o Glu (E),
X₄ es Leu (L) o Ile (I),
X₆ es cualquier aminoácido,
X₇ es Arg (R) o Pro (P),
X₈ es Asp (D) o Lys (K),
X₉ es Leu (L) o Val (V),
X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E) o Ser (S),
X₁₁ es Arg (R) o Asn (N),
X₁₂ es Val (V) o Ile (I),
X₁₃ es cualquier aminoácido,
X₁₄ es Asp (D) o Glu (E), y
X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID nº 43).

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

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

X₁ es His (H) o Glu (E),

X₄ es Leu (L) o Ile (I),

5 X₇ es Arg (R) o Pro (P),

X₈ es Asp (D) o Lys (K),

X₉ es Leu (L) o Val (V),

X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E) o Ser (S),

X₁₂ es Val (V) o Ile (I),

10 X₁₄ es Asp (D) o Glu (E), y

X₁₅ es Glu (E) o Lys (K) (SEC ID n° 44).

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

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

X₆ es cualquier aminoácido,

X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E), y

X₁₃ es cualquier aminoácido (SEC ID n° 45).

20 Se dan a conocer además ADN polimerasas que pueden caracterizarse porque presentan el motivo siguiente:

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

X₆ es cualquier aminoácido diferente de Ser (S),

X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E), y

25 X₁₃ es cualquier aminoácido diferente de Phe (F) (SEC ID n° 46).

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

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

30 X₆ es Ser (S), Gly (G), Ala (A), Asp (D), Phe (F), Lys (K), Cys (C), Thr (T) o Tyr (Y),

X₁₀ es Ser (S), Gln (Q), Ala (A), Gly (G), Lys (K) o Arg (R), y

X₁₃ es Phe (F), Ala (A), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y), Asp (D) or Lys (K) (SEC ID n° 47).

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

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

X₆ es Ser (S), Gly (G), Ala (A), Asp (D), Phe (F), Lys (K), Cys (C), Thr (T) o Tyr (Y),

X₁₀ es Lys (K), y

X₁₃ es Phe (F), Ala (A), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y), Asp (D) o Lys (K) (SEC ID n° 48).

40 Este motivo se encuentra presente en el dominio de "dedos" de muchas ADN polimerasas dependientes de ADN de familia A, particularmente las ADN polimerasas termoestables de bacterias termofílicas (Li et al., EMBO J. 17:7514-7525, 1998). Por ejemplo, la figura 1 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos que comprende la secuencia nativa correspondiente al motivo anteriormente indicado en ADN polimerasas de varias especies de bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus stearothermophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermosiphon africanus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neopolitana*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus* sp. Sps17, *Thermus* sp. Z05 y *Thermus thermophilus*. Tal como se muestra, el motivo de SEC ID n° 8, excepto en el que X₁₀ es E, S, A o G, se encuentra presente en cada una de dichas polimerasas, indicando una función conservada de esta región de la polimerasa. La figura 2 proporciona identidades de secuencia entre dichas ADN polimerasas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se da a conocer una polimerasa que comprende SEC ID n° 8, 9, 10 o 11 (por ejemplo en la que X₁₀ se selecciona, según resulte apropiado en la secuencia de consenso, de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, K, R o H), que presenta la actividad y/o las características mejoradas indicadas en la presente memoria, y en la que la ADN polimerasa de otro modo es una ADN polimerasa de tipo salvaje o natural, tal como, por ejemplo, una polimerasa de cualquiera de las especies de bacterias termofílicas listadas anteriormente, o es sustancialmente idéntica a dicha ADN polimerasa de tipo salvaje o natural. Por ejemplo, la polimerasa comprende SEC ID n° 8, 9, 10 o 11 y es idéntica por lo menos al 80%, 85%, 90% o 95% respecto a SEC ID n° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 36, 37, 38, 39, 40 o 41. En una variación, la forma no modificada de la polimerasa es una especie del género *Thermus*. Se da a conocer además que la polimerasa no modificada procede de una especie termofílica de un género diferente de *Thermus*, por ejemplo de *Thermotoga*. Se encuentran disponibles las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos completa para numerosas ADN polimerasas termoestables. Cada una de las secuencias de *Thermus aquaticus* (Taq) (SEC ID n° 2), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEC ID n° 6), *Thermus* sp. Z05 (SEC ID n° 1), *Thermus* species Sps17 (SEC ID n° 5), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEC ID n° 2) y *Thermosiphon africanus* (Taf) (SEC ID n° 37) han sido publicadas en la solicitud publicada de patente internacional PCT n° WO 92/06200. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermus flavus* (SEC ID n° 4) ha sido publicada en Akhmetzjanov y Vakhitov

(Nucleic Acids Research 20:5839, 1992). La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus caldophilus* (SEC ID nº 7) se encuentra en EMBL/GenBank nº de acceso U62584. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* puede recuperarse del depósito nº 42380 de la ATCC utilizando, por ejemplo, los métodos proporcionados en la patente US nº 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la Tabla 1. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana* (SEC ID nº 39) es de la base de datos de patentes GeneSeq nº R98144 y del documento nº PCT WO 97/09451. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Bacillus caldotenax* (SEC ID nº 41) se describe en, por ejemplo, Uemori et al. (J Biochem (Tokyo) 113(3):401-410, 1993; ver también el nº de acceso de la base de datos Swiss-Prot Q04957 y los nº de acceso de GenBank D12982 y BAA02361). Los ejemplos de formas no modificadas de ADN polimerasas que pueden modificarse tal como se indica en la presente memoria también se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 6.228.628, nº 6.346.379, nº 7.030.220, nº 6.881.559, nº 6.794.177 y nº 6.468.775, y las solicitudes de patente US nº 20040005599; 20020012970; 20060078928 y 20040115639. También se proporcionan secuencias representativas de polimerasas de longitud completa en el listado de secuencias.

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

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

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

T-G-R-L-S-S-X₇-X₈-P-N-L-Q-N, en el que:
X₇ es Ser (S) o Thr (T), y
X₈ es cualquier aminoácido diferente de D o E (SEC ID nº 27).

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

Se da a conocer además que el aminoácido en la posición X₁₀ se sustituye por un aminoácido tal como se indica en SEC ID nº 8, 9, 10 o 11, y el aminoácido en la posición X₈ se sustituye por un aminoácido tal como se indica en SEC ID nº 27. De esta manera, el aminoácido en la posición X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de Glu (E), Ser (S), Ala (A) o Gly (G), y el aminoácido en la posición X₈ es cualquier aminoácido diferente de Asp (D) o Glu (E). Se da a conocer además que entre las sustituciones de aminoácidos se incluyen leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (N), arginina (R) y lisina (K) en la posición X₈ de SEC ID nº 27. Se da a conocer además que en el caso de que la ADN polimerasa de la invención se derive de *Thermus* sp., entre las sustituciones de aminoácidos se incluyen independientemente alanina (A), glicina (G), lisina (K) o arginina (R) en la posición X₁₀ y glicina (G) en la posición X₈. Se da a conocer además que entre las sustituciones de aminoácidos se incluyen independientemente lisina (K) en la posición X₁₀ y glicina (G) en la posición X₈. Pueden determinarse otras u otras sustituciones de aminoácidos en uno o más de los sitios identificados, utilizando, por ejemplo, métodos conocidos de mutagénesis dirigida a sitio y la determinación del rendimiento de extensión de polinucleótido en ensayos descritos adicionalmente en la presente memoria o de otro modo conocidos por el experto en la materia.

Debido a que la longitud exacta de las ADN polimerasas varía, las posiciones aminoácidas exactas correspondientes a cada uno de X₁₀ y X₈ pueden variar dependiendo de la polimerasa particular utilizada. Los programas de alineación de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos se encuentran disponibles fácilmente (ver, por ejemplo, los

indicados *supra*) y, dados los motivos particulares identificados en la presente memoria, sirven para ayudar en la identificación de los aminoácidos exactos (y codones correspondientes) para la modificación según la presente invención. Las posiciones correspondientes a cada uno de X₆, X₁₀, X₁₃ y X₈ se muestran en la Tabla 1 para ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas y ADN polimerasas termoestables de especies termofílicas ejemplares.

Tabla 1. Posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de motivo X₃, X₁₀, X₁₃ (por ejemplo de SEC ID nº 8, 9, 10 y 11) y X₈ (de SEC ID nº 27) en las polimerasas ejemplares.

Organismo o secuencia quimérica	Posición de aminoácido			
Consenso (SEC ID nº)	X6	X10	X13	X8 (de SEC ID nº 27).
<i>T. thermophilus</i> (6)	488	493	497	580
<i>T. caldophilats</i> (7)	488	493	497	580
<i>T. sp.</i> Z05 (1)	488	493	497	580
<i>T. aquaticus</i> (2)	486	491	495	578
<i>T. flavus</i> (4)	485	490	494	577
<i>T. filiformis</i> (3)	484	489	493	576
<i>T. sp.</i> Sps17 (5)	484	489	493	576
<i>T. maritima</i> (38)	548	553	557	640
<i>T. neapolitana</i> (39)	548	553	557	640
<i>T. africanus</i> (37)	548	553	557	639
<i>B. caldotenax</i> (41)	530	535	539	621
<i>B. stearothermophilus</i> (40)	530	535	539	620
CS5 (29)	548	553	557	640
CS6 (30)	548	553	557	640

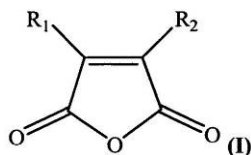
En algunas realizaciones, la ADN polimerasa mutante de la presente invención se deriva de la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (SEC ID nº 1) o una variante de la misma (por ejemplo D580G o similar). Tal como se ha indicado anteriormente, en la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. nativa, la posición X₁₀ corresponde al ácido glutámico (E) en la posición 493; la posición X₆ corresponde a la serina (S) en la posición 488; la posición X₁₃ corresponde a la fenilalanina (F) en la posición 497 de SEC ID nº 1, y la posición X₈ de la SEC ID nº 27 corresponde al aspartato (D) en la posición 580 de la SEC ID nº 1. De esta manera, se da a conocer que la polimerasa mutante comprende por lo menos una sustitución de aminoácido, respecto a la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp., en E493, S488, F497 y D580. De esta manera, se da a conocer que el aminoácido en la posición E493 no es E. Se da a conocer además que el aminoácido en la posición 493 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, K, R o H. Se da a conocer además que el residuo aminoácido en la posición E493 es S, A, Q, G, K o R. En determinadas realizaciones, el residuo aminoácido en la posición E493 es A, G, K o R. Se da a conocer además que típicamente el aminoácido en la posición S488, en caso de sustituirse, no es S. Se da a conocer además que el aminoácido en la posición 488 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, F, W, P, E, T, C, N, Q, D, Y, K, R o H. Se da a conocer además que el residuo aminoácido en la posición S488 puede sustituirse o no sustituirse, y es S, G, A, D, F, K, C, T o Y. Se da a conocer además que típicamente el aminoácido en la posición F497, en caso de sustituirse, no es F. Se da a conocer además que el aminoácido en la posición 497 se selecciona de entre G, A, V, L, I, M, E, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, K, R o H. Se da a conocer además que el residuo aminoácido en la posición F497 puede sustituirse o no sustituirse, y es F, A, G, S, T, Y, D o K. Se da a conocer además que los residuos aminoácidos en la posición D580 pueden seleccionarse de entre leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (N), arginina (R) y lisina (K). Entre las ADN polimerasas Z05 de *Thermus* sp. mutantes se incluyen las que comprenden la sustitución o sustituciones de aminoácidos E493K y D580G.

Entre las ADN polimerasas Z05 de *Thermus* sp. ejemplares se incluyen las que comprende la sustitución o sustituciones de aminoácidos E493S, E493A, E493Q, E493G, E493K, E493R, S488F, S488T, S488Y, S488G, S488A, S488D, S488K, S488C, F497Y, F497S, F497T, F497A, F497G, F497D, F497K y/o D580G. Se da a conocer además que la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos aminoácidos E493 K (o E493A, E493Q, E493G, E493S, E493R) y D580G. Se da a conocer además que la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos aminoácidos E493 K (o E493A, E493Q, E493G, E493S, E493R) y S488F (o S488T, S488Y, S488G, S488A, S488D, S488K, S488C). Se da a conocer además que la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos aminoácidos E493 K (o E493A, E493Q, E493G, E493S, E493R) y F497S (o F497Y, F497T, F497A, F497G, F497D, F497K). Se da a conocer además que la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos aminoácidos E493 K (o E493A, E493Q, E493G, E493S, E493R), F497S (o F497Y, F497T, F497A, F497G, F497D, F497K) y S488F (o S488T, S488Y, S488G, S488A, S488D, S488K, S488C). Se da a conocer además que la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos aminoácidos seleccionados independientemente de entre E493K (o E493A, E493Q, E493G, E493S, E493R), F497S (o F497Y, F497T, F497A, F497G, F497D, F497K), S488F (o S488T, S488Y, S488G, S488A, S488D, S488K, S488C) y/o D580G).

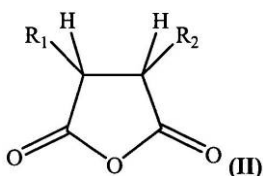
Se da a conocer que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermus*, y el aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 es un aminoácido que no presenta una cadena lateral con carga negativa polar a pH neutro (por ejemplo E). De esta manera, se da a conocer que la ADN polimerasa se deriva de una especie de *Thermus* y el aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 presenta una cadena lateral sin carga polar (por ejemplo S, Q), una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo A, G) o una cadena lateral con carga positiva polar (por ejemplo R o K) a pH neutro (por ejemplo aproximadamente pH 7,4). En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 presenta una cadena lateral sin carga no polar (por ejemplo A, G) o una cadena lateral con carga positiva polar por ejemplo R o K). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de la SEC ID nº 1 que presenta una cadena lateral con carga positiva polar es R o K. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 493 de SEC ID nº 1 que presenta una cadena lateral con carga positiva polar es K.

En algunas realizaciones, las ADN polimerasas de la presente invención también pueden incluir otras modificaciones no por sustitución. Entre dichas modificaciones pueden incluirse, por ejemplo, modificaciones covalentes que es conocido de la técnica que confieren una ventaja adicional en aplicaciones que comprenden la extensión de polinucleótidos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la ADN polimerasa mutante incluye además una modificación covalente térmicamente reversible. Las ADN polimerasas que comprenden dichas modificaciones térmicamente reversibles resultan particularmente adecuadas para las aplicaciones de inicio en caliente tales como, por ejemplo, diversas técnicas de PCR de inicio en caliente. Los reactivos modificadores térmicamente reversibles que pueden utilizarse de acuerdo con las ADN polimerasas mutantes de la presente invención se describen en, por ejemplo, la patente US nº 5.773.258.

Por ejemplo, las polimerasa particularmente adecuadas que comprenden una modificación covalente térmicamente reversible son:



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



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

Las ADN polimerasas de la presente invención pueden construirse mutando las secuencias de ADN que codifican la polimerasa no modificada correspondiente (por ejemplo una polimerasa de tipo salvaje o una variante correspondiente a partir de la que se deriva la polimerasa de la invención), tal como mediante la utilización de técnicas comúnmente denominadas mutagénesis dirigida a sitio. Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la forma no modificada de la polimerasa pueden mutarse mediante una diversidad de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky editores, 1995, Academic Press, San Diego, CA), capítulo 14; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

A título de ejemplo no limitativo, el sistema de dos cebadores, utilizado en el kit de mutagénesis dirigida a sitio Transformer de Clontech, puede utilizarse para introducir mutantes dirigidos a sitio en un polinucleótido codificante de una forma no modificada de la polimerasa. Tras la desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores con el plásmido: uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida a sitio deseada; el otro contiene una mutación en otro punto en el plásmido que resulta en la eliminación de un sitio de restricción. A continuación, se lleva a cabo la síntesis de segunda cadena, ligando estrechamente dichas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de *E. coli*. Se aísla el ADN plasmídico a partir de las bacterias transformadas, cortadas con el enzima de restricción relevante (linearizando de esta manera los plásmidos no mutados) y después se transforma nuevamente en *E. coli*. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin la necesidad de subclonación o la generación de fagémidos de cadena sencilla. El ligamiento estrecho de las dos mutaciones y la posterior linearización de plásmidos no mutados resulta en una elevada eficiencia de mutación y permite un cribado mínimo. Tras la síntesis del cebador

inicial de sitio de restricción, este método requiere la utilización de únicamente un nuevo tipo de cebador por cada sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, puede sintetizarse un juego de cebadores oligonucleótidos "diseñados degenerados" con el fin de introducir todas las mutaciones deseadas en un sitio dado simultáneamente. Los transformantes pueden cribarse mediante secuenciación del ADN plasmídico pasando por la región mutagenizada con el fin de identificar y separar los clones mutantes. Cada ADN mutante seguidamente puede cortarse y analizarse mediante electroforesis, tal como, por ejemplo, en un gel Mutation Detection Enhancement gel [gel de detección mejorada de mutaciones] (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) para confirmar que no se han producido otras alteraciones en la secuencia (mediante comparación del desplazamiento de las bandas con el control no mutagenizado). Alternativamente, puede secuenciarse la región de ADN entera para confirmar que no se han producido sucesos de mutación adicionales en el exterior de la región diana.

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

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

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

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

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

En un aspecto de la presente invención, se introduce en una célula un ácido nucleico codificante de una ADN polimerasa de la invención, solo o en combinación con un vector. Por "se introduce en" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se hace referencia a que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la integración, amplificación y/o expresión posteriores del ácido nucleico. El método de introducción está dictado en gran medida por el tipo celular diana. Entre los métodos ejemplares se incluyen la precipitación con CaPO_4 , la fusión de liposomas, Lipofectin®, la electroporación, la infección vírica y similares.

En algunas realizaciones se utilizan procariotas como células huésped para las etapas de clonación iniciales de la presente invención. Resultan particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la producción de ADN molde de cadena sencilla utilizado para la mutagénesis dirigida a sitio, para el cribado de muchos mutantes simultáneamente y para la secuenciación de ADN de los mutantes generados. Entre las células huésped procarióticas adecuadas se incluyen *E. coli* K12 cepa 94 (ATCC nº 31.446), *E. coli* cepa W3110 (ATCC nº 27,325), *E. coli* K12 cepa DG116 (ATCC nº 53,606), *E. coli* X1776 (ATCC No. 31,537) y *E. coli* B; sin embargo, muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539 y muchas otras especies y géneros de procariotas, incluyendo bacilos tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacteriáceas tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas* pueden ser utilizados como huéspedes. Las células huésped procarióticas u otras células huésped con paredes celulares rígidas se transforman típicamente utilizando el método de cloruro de calcio tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al., supra. Alternativamente, puede utilizarse la electroporación para la transformación de estas células. Las técnicas de transformación de procariotas se describen en, por ejemplo, Dower, en Genetic Engineering, Principles and Methods 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan et al., Meth. Enzymol., 204:63, 1991. Entre los plásmidos utilizados típicamente para la transformación de *E. coli* se incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 y Bluescript M13, la totalidad de los cuales se describe en las secciones 1.12 a 1.20 de Sambrook et al., supra. Sin embargo, también se encuentran disponibles otros muchos vectores adecuados.

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

Tras la purificación, puede someterse a ensayo la discriminación de no correspondencias 3' de una ADN polimerasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se determina la actividad de discriminación de no correspondencias 3' mediante la comparación de la amplificación de una secuencia diana perfectamente correspondiente con el cebador, y la amplificación de una diana que presenta una no correspondencia de una sola base en el extremo 3' del cebador. La amplificación puede detectarse, por ejemplo, en tiempo real mediante la utilización de sondas TaqMan™. La capacidad de una polimerasa de distinguir entre las dos secuencias diana puede estimarse comparando las Cp de las dos reacciones. Opcionalmente, puede llevarse a cabo la amplificación simultánea de un segundo gen diana en cada pocillo y detectarse en un segundo canal óptico a modo de control. La expresión "valor de delta Cp" se refiere a

la diferencia en valor entre la Cp asociada al molde con no correspondencias menos la Cp de la diana correspondiente (ver, por ejemplo, la sección de Ejemplos). En algunas realizaciones, las polimerasas mejoradas de la invención presentan un valor de delta Cp de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5 o más en comparación con una polimerasa de control de otro modo idéntica que presenta un aminoácido nativo (por ejemplo E) en la posición X₁₀ de SEC ID nº 8. En algunas realizaciones, esta determinación se realiza con los materiales precisos y condiciones indicadas en los Ejemplos.

Métodos de la invención

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

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

En algunas realizaciones, las polimerasas mejoradas se utilizan para la extensión de polinucleótidos en el contexto de la PCR específica de alelo o la detección de polimorfismos de nucleótido único (PNU). Se describen métodos ejemplares de detección de PNU en Chen et al., "Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput", *Pharmacogenomics J.* 3(2):77-96, 2003; Kwok et al., "Detection of single nucleotide polymorphisms", *Curr. Issues Mol. Biol.* 5(2):43-60 (abril de 2003); Shi, "Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes", *Am. J. Pharmacogenomics* 2(3):197-205, 2002, y Kwok, "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms" *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:235-58, 2001. Las técnicas ejemplares para la detección de alto rendimiento de PNU se describen en Marnellos, "High-throughput SNP analysis for genetic association studies", *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 6(3):317-21 (mayo de 2003). Entre los métodos de detección de PNU comunes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ensayos TaqMan, ensayos de baliza molecular, matrices de ácidos nucleicos, extensión de cebador específico de alelo, PCR específica de alelo, extensión de cebadores ordenados, ensayos homogéneos de extensión de cebadores, extensión de cebador con detección mediante espectrometría de masas, pirosecuenciación, extensión multiplex de cebadores ordenados en matrices génicas, ligamiento con amplificación de círculo rodante, ligamiento homogéneo, OLA (patente US nº 4.988.167), reacción multiplex de ligamiento ordenada sobre matrices génicas, polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción, ensayos de etiqueta de extensión de base única y el ensayo Invader. Dichos métodos pueden utilizarse en combinación con mecanismos de detección tales como, por ejemplo, la detección mediante luminiscencia o quimioluminiscencia, la detección de fluorescencia, la detección de fluorescencia resuelta en el tiempo, la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, la polarización de fluorescencia, la espectrometría de masas y la detección eléctrica.

La detección de múltiples alelos diferentes también puede llevarse a cabo utilizando reacciones multiplex, que permiten la detección de múltiples alelos diferentes en una sola reacción. En las reacciones multiplex, se utilizan dos o más cebadores específicos de alelo para extender y amplificar PNU o múltiples polimorfismos de nucleótidos o

alelos. Se describen métodos ejemplares de detección múltiplex de polimorfismos de nucleótidos únicos y múltiples en la publicación de patente US nº 2006/0172324.

Entre otros métodos para detectar productos de extensión o productos de amplificación utilizando las polimerasas mejoradas descritas en la presente memoria se incluyen la utilización de pigmentos de unión a nucleótidos de doble cadena fluorescentes o pigmentos intercalantes de nucleótidos de doble cadena fluorescentes. Entre los ejemplos de pigmentos de unión a ADN de doble cadena fluorescentes se incluyen verde SYBR (Molecular Probes). Entre los ejemplos de pigmentos intercalantes de doble cadena fluorescentes se incluyen bromuro de etidio. Los pigmentos de unión a ADN de doble cadena pueden utilizarse conjuntamente con el análisis de curvas de fusión para medir los productos de extensión de cebadores y/o los productos de amplificación. El análisis de curvas de fusión puede llevarse a cabo en un instrumento de PCR en tiempo real, tal como el instrumento ABI 5700/7000 (formato de 96 pocillos) o ABI 7900 (formato de 384 pocillos) con software incorporado (SDS 2.1). Alternativamente, el análisis de curvas de fusión puede llevarse a cabo como un análisis de punto final. Se describen métodos ejemplares de análisis de punto de fusión en la publicación de patente US nº 2006/0172324.

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

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

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

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

5 Entre las variaciones de los métodos de secuenciación de terminación de cadena se incluyen la secuenciación de pigmento-cebador y la secuenciación de pigmento-terminador. En la secuenciación de pigmento-cebador, los terminadores ddNTP no se encuentran marcados y se utiliza un cebador marcado para detectar los productos de extensión (Smith et al., Nature 32:674-679, 1986). En la secuenciación del ADN de pigmento-terminador, se utiliza una ADN polimerasa para incorporar los dNTP y ddNTP marcados fluorescentemente en el extremo de un cebador de ADN (Lee et al., Nuc. Acids Res. 20:2471, 1992). Este procedimiento ofrece la ventaja de que no resulta necesario sintetizar cebadores marcados con pigmento. Además, las reacciones de terminador-pigmento resultan más convenientes en el aspecto de que las cuatro reacciones pueden llevarse a cabo en el mismo tubo.

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

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

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

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

Kits

55 En otro aspecto de la presente invención se proporcionan kits para la utilización en métodos de extensión de cebador descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit se encuentra compartimentalizado para facilitar el uso y contiene por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de la invención que presenta una discriminación de no correspondencias 3' incrementada según la presente invención. También puede incluirse uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualesquiera reactivos u otros elementos reconocidos por el experto en la materia para la utilización en los procedimientos de extensión de cebadores según los métodos indicados anteriormente, incluyendo reactivos para la utilización en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación del ADN o procedimientos de marcaje de ADN. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el kit incluye además un recipiente que proporcionar un cebador de sentido 5' hibridable, bajo condiciones de extensión de cebador, a un polinucleótido molde predeterminado, o una pareja de cebadores que comprende el cebador de sentido 5' y un cebador antisentido 3' correspondiente. En algunas realizaciones, el kit incluye uno o más recipientes que contienen uno o más cebadores que son totalmente complementarios a

polimorfismos de nucleótido único o a polimorfismos de múltiples nucleótidos, en el que los cebadores resultan útiles para reacciones multiplex, tal como se ha indicado anteriormente. En otras variaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan nucleósidos trifosfato (convencionales y/o no convencionales). En realizaciones específicas, el kit incluye dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP y/o dNTP marcados tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de los pigmentos de la familia de la fluoresceína o de la cianina. En todavía otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebador. En algunas realizaciones, el kit incluye una o más sondas marcadas o no marcadas. Entre los ejemplos de sondas se incluyen sondas FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) de marcaje dual y sondas de baliza molecular. En otra realización, el kit contiene un aptámero, por ejemplo para ensayos de PCR de inicio en caliente.

Mezclas de reacción

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

EJEMPLOS

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

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

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

Generación de biblioteca clonal: un ácido nucleico codificante del dominio de polimerasa de la ADN polimerasa Z05 D580G se sometió a PCR con tendencia a errores (mutagénica) entre los sitios de restricción Bln I y Bgl II de un plásmido que incluía esta secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia amplificada se proporciona como SEC ID nº 33. Los cebadores utilizados para ello se proporcionan a continuación:
Cebador directo: 5'-CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3' (SEC ID nº 31) y
Cebador inverso: 5'-ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTA-3' (SEC ID nº 32).

Se llevó a cabo una PCR utilizando un abanico de concentraciones de Mg^{2+} de entre 1,8 y 3,6 mM con el fin de generar bibliotecas con un abanico de tasas de mutación. Las condiciones de tampón fueron bicina 50 mM, pH 8,2, KOAc 115 mM, glicerol al 8% p/v y 0,2 mM de cada dNTP. Se utilizó el enzima de PCR de inicio en caliente GeneAmp® AccuRT a razón de 0,15 U/ml. Partiendo de 5×10^5 copias de ADN plasmídico Z05 D580G linealizado por cada volumen de reacción de 50 μ l, las reacciones se desnaturalizaron utilizando una temperatura de 94°C durante 60 segundos, seguido de 30 ciclos de amplificación utilizando una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 15 segundos, una temperatura de hibridación de 60°C durante 15 segundos, una temperatura de extensión de 72°C durante 120 segundos y seguido de una extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 minutos.

El amplicón resultante se purificó con un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) y se cortó con Bln I y Bgl II y después se purificó nuevamente con un kit de purificación por PCR QIAquick. Se preparó un vector plasmídico Z05 D580G mediante corte con los mismos dos enzimas de restricción y con tratamiento con fosfatasa alcalina, recombinante (RAS, nº de cat. 03359123001) y se purificó con un kit de purificación por PCR

QIAquick. El vector cortado y el inserto mutado se mezclaron en una proporción de 1:3 y se trataron con ADN ligasa de T4 durante 5 minutos a temperatura ambiente (kit NEB Quick Ligation™). Las ligaciones se purificaron con un kit de purificación por PCR QIAquick y se transformaron en una cepa huésped *E. coli* mediante electroporación.

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

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

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

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

Componente	Concentración
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
Ácido cítrico·H ₂ O	2 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
NaNH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O	3,5 g/l
MgSO ₄	2 mM
Ácidos casamino	2,5 g/l
Glucosa	2 g/l
Tiamina·HCl	10 mg/l
Ampicilina	100 mg/l

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

- 45 Tabla 3. Tampón de lisis

Componente	Concentración o porcentaje
Tris, pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	6 mM
Tween 20	0,5% v/v
Lisozima (de polvos)	1 mg/ml
ADNasa I	0,05 unidades/µl

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

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

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

Tabla 4.

Enzima	Pendiente de correspondencia perfecta (CP)	Pendiente de no correspondencia (NC)	Pendiente NC / Pendiente CP
Z05 D580G	8,29	8,04	0,97
Z05 D580G Q416H E493K P733L	20,00	0,76	0,04

Diversas sustituciones de aminoácidos en la posición E493 de Z05: se examinó el efecto de diversas sustituyentes en la posición E493 de la ADN polimerasa Z05 sobre la discriminación de no correspondencias en la PCR específica de alelo. Se crearon dichas sustituciones tanto en la ADN polimerasa Z05 como en la ADN polimerasa D580G mediante mutagénesis dirigida a sitio basada en PCR o mediante clonación de fragmentos génicos sintéticos en vectores para uno o ambos enzimas y se purificaron y se cuantificaron los enzimas mutantes expresados. Se compararon Z05 E493 mutantes G (glicina), K (lisina) y R (arginina) y Z05 D580G mutantes A (alanina), G (glicina), K (lisina) y R (arginina) con el enzima parental respectivo en un ensayo de PCR específico de alelo.

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

Se utilizaron cebadores que amplificaban una región del gen BRAF humano y que eran perfectamente correspondientes con la diana en el caso de que dicha diana portase una mutación en el codón 600 de BRAF, V600K. Contra la diana BRAF de tipo salvaje, presente en el ADN genómico humano, el cebador selectivo de alelo resulta en una única no correspondencia A:C en el extremo 3'. El cebador común es perfectamente correspondiente con el gen BRAF, al igual que la secuencia de sonda, lo que permite la detección TaqMan en tiempo real de la amplificación. Cada reacción presentaba 10.000 copias (33 ng) de ADN genómico de línea celular humana de tipo salvaje o bien 10.000 o 100 copias de un plásmido linearizado que contenía la secuencia mutante BRAF V600R en un volumen final de 16 µl. Para considerar los diferentes óptimos salinos de los enzimas, se llevaron a cabo amplificaciones utilizando un rango de concentraciones de KCl de 25 a 130 mM. Las condiciones del tampón fueron Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, UNG 0,02 U/ml y 200 nM de aptámero. Los

cebadores directo e inverso se encontraban a una concentración de 100 nM y la sonda, de 25 nM. Todas las ADN polimerasas se sometieron a ensayo a 20 nM y se añadió tampón de almacenamiento de enzima al 2% (v/v) (glicerol al 50% v/v, KCl 100 mM, Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,5%) a las reacciones. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico LightCycler 480 de Roche y se desnaturalizaron utilizando una temperatura de 95°C durante 60 segundos, seguido de 99 ciclos de amplificación, utilizando una temperatura de desnaturalización de 92°C durante 10 segundos y una temperatura de hibridación de 62°C durante 30 segundos.

Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, se calcularon los puntos de cruce ("Cp") mediante el método de cuant. abs./max. de 2a derivada y se calcularon los promedios de las Cp. Se calculó la eficiencia de la PCR a partir de la pendiente de las reacciones de plásmido de correspondencia perfecta de 100 y de 10.000 copias a la concentración de KCl que resultaba en la Cp más temprana de plásmido de correspondencia perfecta de 10.000 copias. La delta Cp de alto número de copia es igual a la diferencia entre los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana genómica de tipo salvaje con no correspondencia 3' y los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana plasmídica con correspondencia perfecta.

La tabla a continuación contiene los valores de Cp promediados a la concentración de KCl para cada enzima que resultaron en el Cp de plásmido de alto número de copia más temprano y la eficiencia calculada de la PCR y la delta Cp de alto número de copia. Los datos indican que varias sustituciones de aminoácidos en la posición E493 de la ADN polimerasa Z05 resultan en una discriminación mejorada de las no correspondencias del cebador en la PCR selectiva de alelo.

Tabla 5. Cp de la amplificación del plásmido mutante BRAF V600K frente al ADN genómico humano utilizando enzimas Z05 mutantes E493

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

Promedio de 4 experimentos

El presente ejemplo demuestra que los enzimas mutantes E493A, E493G, E493K y E493R presentan una detección mejorada de alelos raros en comparación con ambas polimerasas de control, Z05 y Z05 D580G.

Ejemplo 2: ADN polimerasa Taq con mutación E491K

El presente ejemplo muestra que una mutación en la posición E491 de la ADN polimerasa Taq resulta en una discriminación incrementada de no correspondencias 3'.

La posición de aminoácido homóloga de E493 en la ADN polimerasa Z05 es E491 en la ADN polimerasa Taq. Se clonó un fragmento de ADN sintético que contenía una mutación E491K (lisina) en la ADN polimerasa Taq y la proteína expresada se purificó y se cuantificó. A continuación, la ADN polimerasa Taq E491K se comparó con la ADN polimerasa Taq parental en un ensayo de PCR selectivo para alelo.

La ADN polimerasa de control del presente ejemplo es una ADN polimerasa Taq de *Thermus* sp. de SEC ID nº 2. Se utilizaron cebadores que amplificaban una región del gen BRAF humano y que eran perfectamente correspondientes con la diana en el caso de que dicha diana portase una mutación en el codón 600 de BRAF, V600K. Contra la diana BRAF de tipo salvaje, presente en el ADN genómico humano, el cebador selectivo de alelo resulta en una única no correspondencia A:C en el extremo 3'. El cebador común es perfectamente correspondiente con el gen BRAF, al igual que la secuencia de sonda, lo que permite la detección TaqMan en tiempo real de la amplificación. Cada reacción presentaba 10.000 copias (33 ng) de ADN genómico de línea celular humana de tipo salvaje o bien 10.000 o 100 copias de un plásmido linearizado que contenía la secuencia mutante BRAF V600R en un volumen final de 16 µl. Para considerar los diferentes óptimos salinos de los enzimas, se llevaron a cabo amplificaciones utilizando un rango de concentraciones de KCl de 25 a 130 mM. Las condiciones del tampón fueron Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 mM de dATP, 0,2 mM de dCTP, 0,2 mM de dGTP, 0,4 mM de dUTP, 0,2 µM de aptámero y 0,02 U/µl de UNG. Los cebadores directo e inverso se encontraban a una concentración de 100

nM y la sonda, de 25 nM. Todas las ADN polimerasas se sometieron a ensayo a 20 nM y se añadió tampón de almacenamiento de enzima al 2% (v/v) (glicerol al 50% v/v, KCl 100 mM, Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,5%) a las reacciones. Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico LightCycler 480 de Roche y se desnaturalizaron utilizando una temperatura de 95°C durante 60 segundos, seguido de 99 ciclos de amplificación, utilizando una temperatura de desnaturalización de 92°C durante 10 segundos y una temperatura de hibridación de 62°C durante 30 segundos.

Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, se calcularon los puntos de cruce ("Cp") mediante el método de cuant. abs./max. de 2a derivada y se calcularon los promedios de las Cp. Se calculó la eficiencia de la PCR a partir de la pendiente de las reacciones de plásmido de correspondencia perfecta de 100 y de 10.000 copias a la concentración de KCl que resultaba en la Cp más temprana de plásmido de correspondencia perfecta de 10.000 copias. La delta Cp de alto número de copia es igual a la diferencia entre los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana genómica de tipo salvaje con no correspondencia 3' y los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana plasmídica con correspondencia perfecta.

La tabla 6 muestra los valores de Cp promediados a la concentración de KCl para cada enzima que resultaron en el Cp de plásmido de alto número de copia más temprano y la eficiencia calculada de la PCR y la delta Cp de alto número de copia. Los datos indican que una sustitución de aminoácido E491K en la ADN polimerasa Taq resulta en una discriminación mejorada de las no correspondencias del cebador en la PCR selectiva de alelo.

Tabla 6. Cp de la amplificación del plásmido mutante BRAF V600K frente al ADN genómico humano utilizando enzimas Taq mutantes E491

Enzima	100 copias plásmido mutante	10.000 copias plásmido mutante	10.000 copias de ADNg humano	Óptimo de KCl	Eficiencia de la PCR	Delta Cp de alto número de copia
Taq	32,3	25,2	33,3	85	90,9	8,1
Taq E491K	34,4	26,7	36,4	55	82,1	9,7

El presente ejemplo demuestra que el enzima mutante E491K presenta una detección mejorada de alelos raros comparado con el enzima Taq parental de control.

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

El presente ejemplo muestra que las polimerasas que presentan una mutación en la posición S488 de la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. presentan una discriminación incrementada de no correspondencias 3'.

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

Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, se calcularon los puntos de cruce ("Cp") mediante el método de cuant. abs./max. de 2a derivada y se calcularon los promedios de las Cp. Se calculó la eficiencia de la PCR a partir de la pendiente de las reacciones de plásmido de correspondencia perfecta de 100 y de 10.000 copias a la concentración de KCl que resultaba en la Cp más temprana de plásmido de correspondencia perfecta de 10.000 copias. La delta Cp de alto número de copia es igual a la diferencia entre los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana genómica de tipo salvaje con no correspondencia 3' y los valores de Cp de las reacciones con 10.000 copias de diana plasmídica con correspondencia perfecta.

Las condiciones de reacción fueron las indicadas en el Ejemplo 1. La Tabla 7 muestra los valores de Cp promediados a la concentración de KCl para cada enzima que resultaron en el Cp de plásmido de alto número de copia más temprano y la eficiencia calculada de la PCR y la delta Cp de alto número de copia. Los datos en la Tabla 7 indican que varias sustituciones de aminoácidos en la posición S488 de la ADN polimerasa Z05 resultan en una discriminación mejorada de las no correspondencias del cebador en la PCR selectiva de alelo.

Tabla 7. Cp de la amplificación del plásmido mutante BRAF V600K frente al ADN genómico humano

Enzima	100 copias plásmido mutante	10.000 copias plásmido mutante	10.000 copias de ADNg humano	Óptimo de KCl	Eficiencia de la PCR	Delta Cp de alto número de copia (ADNg-plásmido)
Z05	31,3	24,5	26,8	100	96,1	2,3
Z05 S488C	34,8	27,1	36,8	40	81,6	9,7
Z05 S488F	34,3	26,8	35,2	40	84,6	8,4

Z05 S488G	32,5	25,4	30,4	70	90,1	5,0
Z05 S488T	33,4	26,2	34,1	55	89,7	8,0
Z05 S488Y	33,8	26,4	34,6	55	86,1	8,2
Z05 D580G*	31,2	24,3	26,3	115	96,3	2,0
Z05 D580G S488A	31,0	24,2	26,9	100	96,3	2,7
Z05 D580G S488D	32,1	25,0	31,6	70	92,4	6,5
Z05 D580G S488F	32,3	25,2	30,6	85	91,3	5,4
Z05 D580G S488G	31,1	24,5	28,2	100	99,5	3,7
Z05 D580G S488K	31,4	24,6	29,9	100	95,8	5,4
* Promedio de 4 experimentos						

El presente ejemplo demuestra que los enzimas mutantes S488C, S448F, S488G, S488T, S488Y, S488A, S488D y S488K presentan una detección mejorada de alelos raros en comparación con los enzimas de control parentales, Z05 y Z05 D580G.

Ejemplo 4: identificación de polimerasas mutantes adicionales con discriminación incrementada de no correspondencias 3'

El presente ejemplo muestra que las polimerasas que presentan diversas sustituciones en la posición F497 de la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. presentan una discriminación incrementada de no correspondencias 3'. Se crearon dichas sustituciones tanto en la ADN polimerasa Z05 como en la ADN polimerasa D580G mediante clonación de fragmentos génicos sintéticos en vectores para uno o ambos enzimas y los enzimas mutantes expresados se purificaron y se cuantificaron. Se compararon Z05 F497 mutantes A (alanina), G (glicina), S (serina), T (treonina) e Y (tirosina) y Z05 D580G mutantes D (ácido aspártico), K (lisina) y S (serina) con el enzima parental respectivo en un ensayo de PCR específico de alelo.

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

Las condiciones de reacción fueron las indicadas en el Ejemplo 1. La Tabla 8 muestra los valores de Cp promediados a la concentración de KCl para cada enzima que resultaron en el Cp de plásmido de alto número de copia más temprano y la eficiencia calculada de la PCR y la delta Cp de alto número de copia. Los datos indican que varias sustituciones de aminoácidos en la posición F497 de la ADN polimerasa Z05 resultan en una discriminación mejorada de las no correspondencias del cebador en la PCR selectiva de alelo.

Tabla 8. Cp de la amplificación del plásmido mutante BRAF V600K en presencia de ADN genómico humano utilizando enzimas Z05 mutantes F497

Enzima	100 copias plásmido mutante	10.000 copias plásmido mutante	10.000 copias de ADNg humano	Óptimo de KCl	Eficiencia de la PCR	Delta Cp de alto número de copia (ADNg-plásmido)
Z05	31,3	24,5	26,8	100	96,1	2,3
Z05 F497A	39,1	30,1	43,2	25	67,7	13,1
Z05 F497G	39,6	30,6	43,8	25	66,5	13,3
Z05 F497S	39,5	30,7	44,3	25	69,1	13,6
Z05 F497T	40,7	31,4	46,7	25	64,0	15,3
Z05 F497Y	31,0	24,3	26,6	100	98,1	2,4
Z05 D580G*	31,2	24,3	26,3	115	96,3	2,0
Z05 D580G F497D	37,0	28,9	40,8	25	76,9	12,0
Z05 D580G F497K	35,9	27,9	40,7	55	76,9	12,8
Z05 D580G F497S	34,3	26,8	34,7	55	84,1	7,9
* Promedio de 4 experimentos						

El presente ejemplo demuestra que los enzimas mutantes F497A, F497G, F497S, F497T, F497Y, F497D y F497K presentan una detección mejorada de alelos raros en comparación con los enzimas de control parentales, Z05 y Z05 D580G.

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

LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL**SEC ID nº 1: ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05)**

MKAMLPLEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEPVQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVFDKAPSFRHEAYEAYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLVPGFEADDVLATL
 AKKAEREGYEVRIILTADRDLQVLSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKGIGIEKTALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDLKLSELSRVRS
 DLPLEVDFARRREPDRGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 PEPMAELKALAACKEGRVHRAKDPLAGLKDLKEVRGLLAKDLAVLALREGLDLAPSDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDAHRALLAERLQONLLERLKGEELLLWLYQEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRLDVAYLKALSLELAEEIRLEEVEFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPGLVHPRTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNIPIRTPLGQRIRRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDNEL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFGVSPEAVDPLMRAAKTVNFGVLYGMSAHLRSQELAIPEEEAVA
 FIERYFQSFQKVRWIEKTLEEGRRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKSREAAERMAFNMPVQ
 GTAADLMKAMVKLFPHLREMGARMLLQVHDELLEAPQARAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGIGEDWLSAKG

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

MRGMLPLEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEPVQAVYGFSAKSLKALKEDGDAVI
 VVFDKAPSFRHEAYGGYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLASLA
 KKAKEGEGYEVRIILTADKDLQLLSDRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDE
 SDNLPGVKGIGIEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRKPAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDL
 PLEVDFAKRREPDRERLRAFLERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWPPPEGAFVGFVLSRKE
 PMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPMLLAY
 LLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVL
 AHMEATGVRLDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIG
 KTEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLPDLIHPRTGRLHTRFNQT
 ATATGRLSSSDPNLQNIPIVRTPLGQRIRRAFIAEEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSGDNELIR
 VFQEGRDIHTTETASWMFGVPREAVDPLMRAAKTINFGVLYGMSAHLRSQELAIPEEEAQAFI
 ERYFQSFQKVRWIEKTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKSREAAERMAFNMPVQGT
 AADLMKAMVKLFPRLEEMGARMLLQVHDELVLLEAPKERAEEAVARLAKEVMGVPYPLAVPLEV
 EVGIGEDWLSAKE

5

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

MLPILLEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEPVQAVYGFSAKSLKALKEDGEVAIVVF
 DAKAPSFRHEAYEAYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLEVPGFEADDVLATLARKA
 EREGYEVRIILSADRDLQLLSDRIHLLHPEGEVLTGWLQERYGLSPERWVEYRALVGDPSDN
 LPGVPGIGIEKTALKLLKEWGSLEAILKNLDQVKPERVWEAIRNNLDKLQMSLELSRLRTDLPL
 EVDFAKRREPTEGKGLKAFLERLEFGSLLHEFGLLLEAPKEAEEAPWPPPGGAFLGFLLSRPEPM
 WAELLALAGAKEGRVHRAEDPVGALKDLKEIRGLLAKDLSVLALREGREIPPGDDPMLLAYLL
 DPGNTNPEGVARRYGGEWKEDAAARALLSERLWQALYPRVAEEERLLWLYREVERPLAQVLAH
 MEATGVRLDVYPYLEALSQEVAFELERLEAEVHRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPPIGKT
 EKTGKRSTSAAVLELLREAHPIVGRILEYRELMKLKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFNQTAT
 ATGRLSSSDPNLQNIPIVRTPLGQRIRKAFIAEEGHLLVALDYSQIELRVLAHLSGDNELIRVF
 REGKDIHTTETAAMWFGVPPGVDGAMRAAKTVNFGVLYGMSAHLRSQELSIPEEEAAAFIER
 YFQSFQKVRWIAKTLEEGRRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKSREAAERMAFNMPVQGTAA
 DLMKAMVKLFPRRLPLGVRIILQVHDELVLLEAPKARAEAAQLAKETMEGVYPLSVPLEVEV
 GMGEDWLSAKE

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

MAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVVVV
 VFDAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLVPGFEADDVLATLAK
 RAEKEGYEVRILTADRDLQYLLSERIAILHPEGYLITPAWLYEKEYGLRPEQWVDYRALAGDPS
 DNIPGVKGIGEKTAQRLIREWGSLENLFQHLQVPSLREKLQAGMEALALSRLKSQVHTDLP
 LEVDFGRRRTPNLEGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLLEGPKAAEEAPWPPPEGAFGLGFSFSRPEP
 MWAELLALAGAWEGRLHRAQDPLRGLRDLKGVRGILAKDLAVLALREGLDLFPEDDPMLLAYL
 LDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDEAGERALLAERLFQTLKERLKGEERLLWLYEEVEKPLSRVLA
 RMEATGVRLDVAYLQALSLEVEAEVRQLEEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELGLPAIGK
 TEKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVDRILQYRELTKLKNTYIDPLPALVHPKTGRLHTRFNQTA
 TATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIIRAFVAEEGWVLVLDYSQIELRVLAHLSGDNELIRV
 FQEGRDIHTQTASWMFGVSPGVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSAHLRSGELSI PYEEAVAFIE
 RYFQSYPKVRAWIEGTLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGT
 ADLMKLA MVRLF PRLQELGARMLLQVHDELVL EAPKDRAERVAALAKEVMEGVWPLQVPLEVE
 VGLGEDWLSAKE

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

MLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGEVAIVVF
 DAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLVRLVPGFEADDVLATLAKKA
 EREGYEVRILSADRDLQYLLSDRIHLLHPEGEVLT PGWLQERYGLSPERWVEYRALVGDPN
 LPGVPGIGEKTAALKLLKEWGSLEAILKNLDQVKPERVREAIRNNLDKLOMSLELSRLRTDLP
 EVDFAKRREP DWGLKAFLERLEFGSLLHEFGLLLEAPKEAEEAPWPPPGGAFLGFLLSRPEPM
 WAELLALAGAKEGRVHRAEDPVGALKDLKEIRGLLAKDLSVLALREGREIPPGDDPMLLAYLL
 DPGNTNPEGVARRYGGEWKEDAAARALLSERLWQALYPRVAEEERLLWLYREVERPLAQVLAH
 MEATGVRLDV PYLEALSQEVAFELERLEAEVHRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELGLPPIGKT
 EKTGKRSTSAAVLELLREAHPIVGRILEYRELMKLKSTYIDPLPRLVHPKTGRLHTRFNQTAT
 ATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIIRKAFIAEEGHLLVALDYSQIELRVLAHLSGDNELIRV
 REGKDIHTETAAMWFGVPPGVDGAMRRAAKT VNFVLYGMSAHLRSGELSI PYEEAAAFIER
 YFQSF PKVRAWIAKTLEEGRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQGTAA
 DLMKLA MVKLF PRLRPLGVRIILLQVHDELVL EAPKARAEAAQLAKETMEGVYPLSVPLEVEV
 GMGEDWLSAKA

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

MEAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
 FVVVFDAKAPSRHEAYEAYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGYEADDVLATL
 AKKAEKEGYEVRILTADRDLQYLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWEKYGLRPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKGIGEKTAALKLLKEWGSLENLLKNLDRVKPENVREKIKAHLEDRLSLELSRVRT
 DLPLEVDLAQGREPDREGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 PEPMWAELKALAAACRDGRVHRAADPLAGLKDLKEVRGLLAKDLAVLASREGLDLVPGDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEDEAHRALLSERLHRNLLKRLEGEKLLWLYHEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRRDVAYLQALSLELAEEIRRLLEEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDDELRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPSLVHPRTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIIRAFVAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDNEL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFGVPPPEAVDPLMRRAAKT VNFVLYGMSAHLRSGELAI PYEEAVA
 FIERFYFQSF PKVRAWIEKTLEEGRKKGYVETLFGRRRYVPDLNARVKS VREAAERMAFNMPVQ
 GTAADLMKLA MVKLF PRLREMGARMLLQVHDELLLEAPQARAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGMGEDWLSAKG

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

MEAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKEDGYKAV
 FVVFDAKAPSFRHEAYEAYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGYEADDVLATL
 AKNPEKEGYEVRILTADRDLQDLVSDRVAVLHPEGHLITPEWLWQKYGLKPEQWVDFRALVGD
 PSDNLPGVKGIGEKTKALKLLKEWGSLENLLKNLDRVKPENVREKIKAHLEDLRLSLELSRVRT
 DLPLEVDLAQGREPDREGLRAFLERLEFGSLLHEFGLLEAPAPLEEAPWPPPEGAFVGFVLSR
 PEPMWAEKALAAACRDGRVHRAADPLAGLKDLEKVRGLLAKDLAVLASREGLDLVPGDDPMLL
 AYLLDPSNTTPEGVARRYGGEWTEAAHRALLSERLHRNLLKRLQGEKLLWLYHEVEKPLSR
 VLAHMEATGVRLDVAYLQALSLELAEIIRRLLEEVEFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPA
 LGKTQKTGKRSTSAAVLEALREAHPIVEKILQHRELTKLKNTYVDPLPSLVHPNTGRLHTRFN
 QTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQIRRAFAEAGWALVALDYSQIELRVLAHLSGDENL
 IRVFQEGKDIHTQTASWMFGVPPEAVDPLMRRAAKTVNFGVLYGMSAHLRSQELAIPEEEAVA
 FIERYFQSFQKVRWIEKTLEEGRKRGYVETLFGRRRYVPDLNARVKSUREAAERMAFNMPVQ
 GTAADLMKLMVKLFPRLREMGARMLLQVHDELLLEAPQAGAEVAALAKEAMEKAYPLAVPL
 EVEVGMGEDWLSAKG

SEC ID nº 8

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

5 SEC ID nº 9

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X10-R-V-L-F-D-E-L, wherein X10 is an amino acid other than E.

SEC ID nº 10

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X10-R-V-L-F-D-E-L wherein X10 is A, G, K or R.

10

SEC ID nº 11

A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X10-R-V-L-F-D-E-L
 wherein X10 is K.

15 SEC ID nº 12 Z05

EEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPALGKT

SEC ID nº 13 Taq

EAEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPAIGKT

20

SEC ID nº 14 Tfi

EAEVHRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPPIGKT

SEC ID nº 15 Tfi

25 EEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPAIGKT

SEC ID nº 16 Sps17

EAEVHRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLGLPPIGKT

30 SEC ID nº 17 Tth

EEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPALGKT

SEC ID nº 18 Tea

EEEVFRLAGHPFNLNSRDQLERVLFDLRLPALGKT

35

SEC ID nº 19 Tma

AEEIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRGKT

SEC ID nº 20 Tne

40 AEKIYQIAGEPFNINSPKQVSNILFEKLGKIPRGKT

SEC ID nº 21 Taf

KEKVFEIAGETFNLSSTQVAYILFEKLNIAPY-KK

SEC ID nº 23 Dra

ESQIHEYAGEEFHIRSPKQLETVLYDKLELASSKKT

SEC ID nº 24 Bst

5 ERRIYELAGQEFNINSPKQLGTVLFDKLQLPVLKKT

SEC ID nº 25 Bca

EQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFEKLQLPVLKKS

10 **SEC ID nº 26 motivo de consenso nativo**

A-G-X1-X2-F-X3-X4-X5-X6-X7-X8-Q-X9-X10-X11-X12-L-X13-X14-X15-L, wherein X1 is H, E, or Q; X2 is P, T, or E; X3 is N or H; X4 is L or I; X5 is N or R; X6 is S; X7 is R, P, or S; X8 is D, K, or T; X9 is L or V; X10 is E, S, A, or G; X11 is R, N, Y, T, or V; X12 is V or I; X13 is F or Y; X14 is D or E; and X15 is E or K.

15 **SEC ID nº 27 motivo Z05 D580 modificado**

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

en el que X₇ es Ser (S) o Thr (T), y

X₈ es cualquier aminoácido diferente de Asp (D) o Glu (E)

20 **SEC ID nº 28 Sitio activo conservado de ADN polimerasa**

DYSQIELR

SEC ID nº 29 ADN polimerasa CS5

MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
FVVFDAKAPSFRHEAYEAYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
AKKAEREGYEVRIILTADRDLYQLVSDRVAVLHPEGLHITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
PSDNLPGVKGIGECTALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDKLSLELSRVRS
DLPLEVDFARRREPDREGLRAFLERLEFGSLLHEFGLEESEPVGYRIVKDLVEFEKLEIEKLR
ESPSFAIDLETSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDKEVLKKLKEILEDPG
AKIVGQNLKFDYKVLMMVGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRLYKTLSTLKLHEADLENVFYKIEEMPLVNVLA
RMELNGVYVDTEFLKKLSEEGYKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRIKLEKLGKPRGK
TTKTGDYSTRIEVLLEELAGEHEIIPILILEYRKIQKLKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQTG
TATGRLLSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIVPQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDNLLR
AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
VNYFVLYPKVRDYIQRVVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIPQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
AADI IKLAMIEIDRELKERKMRSMIIQVHDELVEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKL SVPL
EVDVTIGKTWS

SEC ID nº 30 ADN polimerasa CS6

MKAMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFFALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGYKAV
FVVFDAKAPSFRHEAYEAYKAGRPTPEDFPRQLALIKELVDLLGFTRLEVPGFEADDVLATL
AKKAEREGYEVRIILTADRDLYQLVSDRVAVLHPEGLHITPEWLWEKYGLKPEQWVDFRALVGD
PSDNLPGVKGIGECTALKLLKEWGSLENILKNLDRVKPESVRERIKAHLEDKLSLELSRVRS
DLPLEVDFARRREPDREGLRAFLERLEFGSLLHEFGLEESEPVGYRIVKDLVEFEKLEIEKLR
ESPSFAIALATSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLDKEVLKKLKEILEDPG
AKIVGQNLKFDYKVLMMVGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
MSFSFPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRLYKTLSTLKLHEADLENVFYKIEEMPLVNVLA
RMELNGVYVDTEFLKKLSEEGYKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRIKLEKLGKPRGK
TTKTGDYSTRIEVLLEELAGEHEIIPILILEYRKIQKLKSTYIDALPKMVNPKTGRIHASFNQTG
TATGRLLSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIVPQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDNLLR
AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
VNYFVLYPKVRDYIQRVVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIPQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
AADI IKLAMIEIDRELKERKMRSMIIQVHDELVEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKL SVPL
EVDVTIGKTWS

25

SEC ID nº 31 Cebador directo

5'-CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3'

SEC ID nº 32 Cebador inverso

5'-ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTAA-3'

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

CTACCTCCTGGACCCCTCCAACACCACCCCGAGGGGGTGGCCCGGCGCTACGGGGGGGAGTG
 GACGGAGGACGCCGCCACCGGGCCCTCCTCGCTGAGCGGCTCCAGCAAAACCTCTTGGAACG
 CCTCAAGGGAGAGGAAAAGCTCCTTTGGCTCTACCAAGAGGTGGAAAAGCCCTCTCCCGGGT
 CCTGGCCACATGGAGGCCACCGGGGTAAGGCTGGACGTGGCCTATCTAAAGGCCCTTTCCCT
 GGAGCTTGCGGAGGAGATTGCGCGCTCGAGGAGGAGGTCTTCCGCCTGGCGGGCCACCCCTT
 CAACCTGAACCTCCCGTGACCACTAGAGCGGGTGCTTTTGACGAGCTTAGGCTTCCCGCCCT
 GGGCAAGACGCAAAAGACGGGGAAGCGCTCCACCAGCGCGGTGCTGGAGGCCCTCAGGGA
 GGCCACCCCATCGTGGAGAAGATCCTCCAGCACCGGGAGCTCACCAAGCTCAAGAACACCTA
 CGTAGACCCCTCCCGGGCCTCGTCCACCCGAGGACGGGCGCCTCCACACCCGCTTCAACCA
 GACAGCCACGGCCACGGGAAGGCTCTCTAGCTCCGGGCCCAACCTGCAGAACATCCCATCCG
 CACCCCTTGGGCCAGAGGATCCGCCGGGCTTCTGTCGCGGAGGCGGGATGGGCGTTGGTGGC
 CCTGGACTATAGCCAGATAGAGCTCCGGGTCTCGCCACCTCTCCGGGGACGAGAACCTGAT
 CAGGGTCTTCCAGGAGGGGAAGGACATCCACACCCAGACCGCAAGCTGGATGTTCCGGCGTCTC
 CCCGGAGGCCGTGGACCCCTGATGCGCGGGCGGCCAAGACGGTGAACCTTCGGCGTCTCTA
 CGGCATGTCCGCCCATAGGCTCTCCCAGGAGCTTGCCATCCCTACGAGGAGGCGGTGGCCTT
 TATAGAGCGCTACTTCCAAAGCTTCCCCAAGGTGCGGGCCTGGATAGAAAAGACCCTGGAGGA
 GGGGAGGAAGCGGGGCTACGTGGAAACCCTCTTCGGAAGAAGGCGCTACGTGCCCGACCTCAA
 CGCCCGGGTGAAGAGCGTCAGGGAGGCCGCGGAGCGCATGGCCTTCAACATGCCCGTCCAGGG
 CACCGCCGCCGACCTCATGAAGCTCGCCATGGTGAAGCTCTTCCCCACCTCCGGGAGATGGG
 GGCCCGCATGCTCCTCCAGGTCCACGACGAGCTCCTCCTGGAGGCCCCCAAGCGCGGGCCGA
 GGAGGTGGCGGCTTTGGCCAAGGAGGCCATGGAGAAGGCCTATCCCTCGCCGTGCCCTGGA
 GGTGGAGGTGGGGATCGGGGAGGACTGGCTTTCCGCCAAGGGCTGATATCAGATCTCCCTGAT
 TATGCGTCAGTCTATGAAGAAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAGAATCCTTGTGAATTT
 AACAGAGGGTATAGGGATTACACGCCACTACCAGTTGGTTAT

5

SEC ID nº 34 - Secuencia de tipo salvaje de BRAF

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTT
 TGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA

SEC ID nº 35 - secuencia mutante BRAF V600R

AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAGGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTT
 TGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTA

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

MADASPDPSKPDALVLIDGHALAFRSYFALPPLNNSKGEMTDAIVGFMKLLRLARQKSNQVI
 VVFDPPVKTLRHEQYEGYKSGRAQTPEDLRGQINRIRALVDALGFPRLEPGYEADDVIASLT
 RMAEGKGYEVRIVTSRDAYQLLDEHVKVIANDFSLIGPAQVEEKYGVTVRQWVDYRALTGDA
 SDNIPGAKGIGPKTAAKLLQEYGTLEKVYEAHAGTLKPDGTRKKLLDSEENVKFSHDLSCMV
 TDLPLDIEFGVRRLPDNPLVTEDDLLELELHSLRPMILGLNGPEQDGHAPDDLLEHAQTPE
 EDEAAALPAFSAPELAEWQTPAEGAVWGYVLSREDDLTAAALLAAATFEDGVARPARVSEPDEW
 AQAEAPENLFGELLPSDKPLTKKEQKALEKAQKDAEKARAKLREQFPATVDEAEFVGQRTVTA
 AAKALAAHLSVRGTVVEPGDDPLLYAYLLDPANTNMPVVAKRYLDREWPADAPTRAAITGHL
 VRELPLDDARRKMYDEMEKPLSGVLGRMEVRGVQVDSDFLQTLISIQAGVRLADLESQIHEY
 AGEEFHIRSPKQLETVLYDKLELASSKTKLTGQRSTAVSALEPLRDAHPIIPLVLEFRELDK
 LRGTYLDPIPNLVNPHTGRLHTTFAQTAVATGRLSSLNPNLQNIPIRSELGREIRKGFIAEDG
 FTLIAADYSQIELRLLAHIADDPLMQQAFVEGADIHRRATAAQLVGLDEATVDANQRRRAAKTVN
 FGVLYGMSAHLNSDLGIPYAEAAATFIEIYFATYPGIRRYINHTLDFGRTHGYVETLYGRRRY
 VPGLSSNRNVQREAEERLAYNMP IQGTAADIMKLAMVQLDPLDQDAIGARMLLQVHDELLIEAP
 LDKAEQVAALTKKVMENVVQLKVPLAVEVGTGPNWFDTK

10

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

MGKMFLFDGTGLVYRAFYAIDQSLQTSGLHTNAVYGLTKMLIKFLKEHISIGKDACVFVLDS
 KGGSKKRKDILETYKANRPSTPDLLLEQIPYVEELVDALGIKVLKIEGFEADDI IATLSKKFE
 SDFEKNIIITGDKDLLQLVSDKVFVWRVERGITDLVLYDRNKVIEKYGIYPEQFKDYLSLVGD
 QIDNIPGVKGIGKKTAVSLLKKYNSLENVLKNINLLTEKLRRLLLEDSEKDLQKSI ELVELIYD
 VPMDEVKDEIIYRGYNPDKLLKVLKKYEFSSIIKELNLQEKLEKEYILVDNEDKLKKLAEIE
 KYKTFSIDTETTSLDPF EAKLVGISISTMEGKAYYIPVSHFGAKNISKSLIDKFLKQILQEKD
 YNIVGQNLKFDYEIFKSMGFSPNVPHFDTMIAAYLLNPDEKRFNLEELSLKYLGYKMISFDEL
 VNENVPLFGNDFSYPPLERAVEYSCEDADVITYRIFRKLGRKIYENEMEKLFEIEMPLIDVLS
 EMELNGVYFDEEYLKELSKKYQEKMDGIKEKVFEIAGETFNLSSTQVAYILFEKLNIAPIYKK
 TATGKFSTNAEVLEELSKEHEIAKLLLEYRKYQKLKSTYIDSIPLSINRKTNRVHTTFHQGT
 STGRLSSSNPNLQNLPTRSEEGKEIRKAVRPQRQDWILGADYSQIELRVLAHVSKDENLLKA
 FKEDLDIHTITAAKIFGVSEMFVSEQMRRVGMVNFIIYGVSPYGLSKRIGLSVSETKKIID
 NYFRYYKGVFEYLKRMKDEARKKGYVTTLFGRRRYIPQLRSKNGNRVQEGERIAVNTPIQGT
 ADIIKIAMINIHNRLLKENLRSMILQVHDELVEVPDNELEIVKDLVRDEMANAVKLDVPLK
 VDVYYGKEWE

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

MARLFLFDGTALAYRAYYALDRSLSTSTGIPTNAVYGVARMVRFIKDHIIVGKDYVAVAFDK
 KAATFRHKLLLETYKAQRPKTPDLLIQQLPYIKKLVEALGMKVLEVEGYEADDI IATLAVKGLP
 LFDEIFIVTGDKDMLQLVNEKIKVWRIVKGISDLELYDAQKVKEKYGVPEPQQIPDLLALTGDE
 IDNIPGVTGIGEKTAVALLEKYKDLEDILNHVRELPOKVRKALLRDRENAILSKKLAIETNV
 PIEINWHEELRYQGYDREKLLPLLKELEFASIMKELQLYEESEPVGYRIVKDLVEFEKLEIEKLR
 ESPSFAIDLETSSLDPFDCDIVGISVSFKPKEAYYIPLHHRNAQNLEKEVLKKLKEILEDPG
 AKIVGQNLKFDYKVLVKGVEPVPPYFDTMIAAYLLEPNEKKFNLDLALKFLGYKMTSYQEL
 MSFSPLFGFSFADVPVEKAANYSCEDADITYRLYKTLCLKHEADLENVFKIEMPLVNVLA
 RMELNGVYVDTEFLKKLSEYGYKKLEELAEIYRIAGEPFNINSPKQVSRILFEKLGKIPRGK
 TTKTGDYSTRIEVLEELAGEHEIIPLEILEYRKIQKLKSTYIDALPKMVNPKTGRIFASFNQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIQVQDPNWWIVSADYSQIELRILAHLSGDNLLR
 AFEEGIDVHTLTASRIFNVKPEEVTEEMRRAGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGVPVKEAEKMI
 VNYFVLYPKVRDYIQRVVSEAKEKGYVRTLFGRKRDIPQLMARDRNTQAEGERIAINTPIQGT
 AADI IKLAMIEIDRELKERKMRSMIIQVHDELVEVPNEEKDALVELVKDRMTNVVKSPL
 EVDVTIGKTWS

SEC ID nº 39 ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

MARLFLFDGTALAYRAYYALDRSLSTSTGIPTNAVYGVARMVVKFIKEHI IPEKDYA AAVAFDK
 KAATFRHKLLVSDKAQRPKTPALLVQQLPYIKRLIEALGFKVLELEGYEADDI IATLAVRAAR
 FLMRFSLITGDKDMLQLVNEKIKVWRIVKGISDLELYDSKKVKERYGVPEPHQIPDLLALTGDD
 IDNIPGVTGIGEKTAVALLGKYRNLEYILEHARELPQVRKALLRDREVAILSKKLATLVNTA
 PVEVDWEEMKYRGYDKRKLLPILKELEFASIMKELQLYEEAEPTGYEIVKDHKTFEDLIEKLR
 EVPSFALDLETSSLDPFNCEIVGISVSFKPKTAYYIPLHHRNAHNLDETLLVLSKLKEILEDPS
 SKIVGQNLKYDYKVLVKGISPVPYPHFDTMIAAYLLEPNEKKFNLEDLSLKLFGYKMTSYQEL
 MSFSSPLFGFSFADVPVDKAAEYSCEDADITYRLYKILSMKLHEAELENVFYRIEMPLVNVLA
 RMEFNWVYVDTEFLKKLSEYGYKKLEELAEKIYQIAGEPFNINSPKQVSNILFEKLGKIPRGK
 TTKTGDYSTRIEVLEEIANEHEIVPLILEFRKILKLKSTYIDTLPKLVNPKTGRFHASFHQTG
 TATGRLSSSDPNLQNLPTKSEEGKEIRKAIQVQDPDWWIVSADYSQIELRILAHLSGDNLVK
 AFEEGIDVHTLTASRIYNVKPEEVNEEMRRVGKMNFSIIYGVTPYGLSVRLGIPVKEAEKMI
 ISYFTLYPKVRSYIQQVVAEAKEKGYVRTLFGRKRDIPQLMARDKNTQSEGERIAINTPIQGT
 AADI IKLAMIDIDEELRKRNMKSRMIIQVHDELVEVPDEEKEELVDLVKNKMTNVVKSPL
 EVDISIGKSW

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

MKNKLVLDGNSVAYRAFFALPLLHNDKGIHTNAVYGFTMMLNKILAEEQPTHILVAFDAGKT
 TFRHETFDYKGGRRQOTPELSEQFPLLRELLKAYRIPAYELDHYEADDIIGTMAARAEREGF
 AVKVISGDRDLTQLASPOVTVEITKKGITDIESYTPETVVEKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDN
 IPGVPGIGEKTAVKLLKQFGTVENVLASIDEIKGEKLENLRQYRDLALLSKQLAAICRDAPV
 ELTLDDIVYKGEDREKVVALFQELGFQSFLDKMAVQTEGEKPLAGMDFAIADSVTDEMLADK
 AALVVEVVDNYHHAPIVGIALANERGRFFLRPETALADPKFLAWLGDETKKKTMFDSKRAAV
 ALKWKGIELRGVVFDDLAAAYLLDPAQAAGDVAATAAKMHQYEAVRSDEAVYKKGAKRTVPDEP
 TLAEHLARKAAAIWALEEPLMDELRRNEQDRLLTELEQPLAGILANMEFTGVKVDTKRLEQMG
 AELTEQLQAVERRIYELAGQEFNINSPKQLGTVLFDKQLPVLKKTGTGYSTADVLEKLAPH
 HEIVEHILHYRQLGKLQSTYIEGLLKVVHPVTGKVHTMFNQALTQTGRLLSSVEPNLQNIPIRL
 EEGRKIRQAFVPSEPDWLI FAADYSQIELRVLAHIAEDDNLIEAFRRGLDIHTKTAMDIFHVS
 EEDVTANMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLAQNLNITRKEAAEFIERYFASFPGVKQYMDNIVQE
 AKQKGVTLLHRRRYLPDITSRNFNVRSAERTAMNTPIQGSAAIIKKAMIDLSVRLREER
 LQARLLLQVHDELILEAPKEEIERLCRLVPEVMEQAVALRVPLKVDYHYGPTWYDAK

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

MKKKLVLDGSSVAYRAFFALPLLHNDKGIHTNAVYGFTMMLNKILAEEEPHTMLVAFDAGKT
 TFRHEAFQYKGGRRQOTPELSEQFPLLRELLRAYRIPAYELNENYEADDIIGTLAARAEQEGF
 EVKVISGDRDLTQLASPHVTVDITKKGITDIEPYTPEAVREKYGLTPEQIVDLKGLMGDKSDN
 IPGVPGIGEKTAVKLLRQFGTVENVLASIDEIKGEKLETLRQHREMAALLSKKLAAIRRDAPV
 ELSLDDIAYQGEDREKVVALFKELGFQSFLEKMESPSSEEEKPLAKMAFTLADRVTEEMLADK
 AALVVEVVEENYHDAPIVGIAVVNEHGRFFLRPETALADPQFVAWLGDETKKKSMFDSKRAAV
 ALKWKGIELCGVSFDLLAAAYLLDPAQGVDDVAAAAMKQYEAVRPDEAVYKKGAKRAVPDEP
 VLAEHLVRKAAAIWALERPFDELRRNEQDRLLVELEQPLSSILAEMEFAGVKVDTKRLEQMG
 EELAEQLRTVEQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFEKLQPLVKKSKTGYSTADVLEKLAPY
 HEIVENILQHYRQLGKLQSTYIEGLLKVVVRPDTKKVHTIFNQALTQTGRLLSSTEPNLQNIPIR
 LEEGRKIRQAFVPSESDWLI FAADYSQIELRVLAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQV
 SEDEVTPNMRRQAKAVNFGIVYGISDYGLAQNLNISRKEAAEFIERYFESFPGVKRYMENIVQ
 EAKQKGVTLLHRRRYLPDITSRNFNVRSAERMAMNTPIQGSAAIIKKAMIDLNARLKEE
 RLQARLLLQVHDELILEAPKEEMERLCRLVPEVMEQAVTLRVPLKVDYHYGSTWYDAK

5 SEC ID nº 42

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

10 SEC ID nº 43
 A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-X₆-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-L-X₁₃-X₁₄-X₁₅-L,
 en el que X₁ es H o E; X₄ es L o I; X₆ es cualquier aminoácido; X₇ es R o P; X₈ es D o K; X₉ es L o V; X₁₀ es cualquier
 aminoácido diferente de E o S; X₁₁ es R o N; X₁₂ es V o I; X₁₃ es cualquier aminoácido; X₁₄ es D o E; y X₁₅ es E o K.

15 SEC ID nº 44
 A-G-X₁-P-F-N-X₄-N-S-X₇-X₈-Q-X₉-X₁₀-R-X₁₂-L-F-X₁₄-X₁₅-L,
 en el que X₁ es H o E; X₄ es L o I; X₇ es R o P; X₈ es D o K; X₉ es L o V; X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de E o
 S; X₁₂ es V o I; X₁₄ es D o E; and X₁₅ es E o K.

20 SEC ID nº 45
 A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L
 en el que X₆ es cualquier aminoácido; X₁₀ es cualquier aminoácido diferente de E; y X₁₃ es cualquier aminoácido.

25 SEC ID nº 46
 A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L en el que X₆ es cualquier aminoácido diferente de S; X₁₀ es
 cualquier aminoácido diferente de E; y X₁₃ es cualquier aminoácido diferente de F.

SEC ID nº 47

A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L

en el que X₆ es S, G, A, D, F, K, C, T, o Y; X₁₀ es S, Q, A, G, K, o R; y X₁₃ es F, A, G, S, T, Y, D o K.

5 **SEC ID nº 48**

A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L

en el que X₆ es S, G, A, D, F, K, C, T, o Y; X₁₀ es K; y X₁₃ es F, A, G, S, T, Y, D o K.

SEC ID nº 49

10 A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L

en el que X₆ es S, G, A, D, F, K, C, T, o Y; X₁₀ es R, K, A o G; and X₁₃ es F, A, G, S, T, Y, D o K.

SEC ID nº 50

A-G-H-P-F-N-L-N-X₆-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-X₁₃-D-E-L

15 en el que X₆ es S; X₁₀ es R, K, A o G; y X₁₃ es F.

SEC ID nº 51

T-G-R-L-S-S-X₇-X₈-P-N-L-Q-N

en el que X₇ es S o T; y X₈ es L, G, T, Q, A, S, N, R o K.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

[0161]

25 <110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH

<120> ADN polimerasas con discriminación incrementada de no correspondencias 3'

<130> 26426 WO-HS

30

<140> No asignado todavía

<141> No asignado todavía

<150> US 61/356,279

35

<151> 2010-06-18

<160> 51

<170> FastSEQ for windows versión 4.0

40

<210> 1

<211> 834

<212> PRT

<213> *Thermus* sp.

45

<220>

<223> ADN polimerasa de *Thermus* sp. Z05 (Z05) Z05 DNA polymerase (Z05)

<400> 1

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

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg
 325 330 335
 Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val 360 Leu Ala Leu Arg Glu Leu Asp
 355 365
 Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr 380 Leu Leu Asp Pro
 370 375 380
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
 385 390 395 400
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln
 405 410 415
 Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
 420 425 430
 Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
 435 440 445
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu
 450 455 460
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
 485 490 495
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
 500 505 510
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 515 520 525
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
 530 535 540
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly
 545 550 555 560
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Gly Arg Leu
 565 570 575
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu
 580 585 590
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
 595 600 605
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 610 615 620
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 625 630 635 640
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val
 645 650 655
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
 660 665 670
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 675 680 685
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 690 695 700
 Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
 705 710 715 720
 Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
 725 730 735
 Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
 740 745 750
 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 755 760 765
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 770 775 780
 Val His Asp Glu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
 785 790 795 800
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
 805 810 815
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 820 825 830
 Lys Gly

<210> 2

<211> 832

5 <212> PRT

<213> *Thermus aquaticus*

<220>

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

10

<400> 2

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

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

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

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

<400> 3

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

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

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

<210> 4

<211> 831

5 <212> PRT

<213> *Thermus flavus*

<220>

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

10

<400> 4

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

Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu
 Gly Pro 275 Lys Ala Ala Glu Glu 280 Ala Pro Trp Pro Pro 285 Pro Glu Gly Ala
 Phe Leu Gly Phe Ser Phe Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu
 305 Ala Leu Ala Gly 310 Ala Trp Glu Gly Arg 315 Leu His Arg Ala Gln Asp
 Leu Ala Leu Arg Gly Leu Arg Asp Leu Lys Gly Val Arg Gly Ile Leu Ala
 340 345 350
 Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp 365 Leu Phe Pro
 370 375 380
 Glu Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr
 Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Trp Thr Glu Asp
 385 390 395 400
 Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Phe Gln Thr Leu Lys
 405 410 415
 Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Arg Leu Trp Leu Tyr Glu Glu Val
 420 425 430
 Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala Arg Met Glu Ala Thr Gly Val
 435 440 445
 Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Glu Ala
 450 455 460
 Glu Val Arg Gln Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro
 465 470 475 480
 Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp Glu
 485 490 495
 Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg Ser
 500 505 510
 Thr Ser Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile Val
 515 520 525
 Asp Arg Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Asn Thr Tyr
 530 535 540
 Ile Asp Pro Leu Pro Ala Leu Val His Pro Lys Thr Gly Arg Leu His
 545 550 555 560
 Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser
 565 570 575
 Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg
 580 585 590
 Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Glu Gly Trp Val Leu Val Val Leu
 595 600 605
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
 610 615 620
 Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Gln
 625 630 635 640
 Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Gly Val Asp Pro Leu
 645 650 655
 Met Arg Arg Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met
 660 665 670
 Ser Ala His Arg Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala
 675 680 685
 Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Tyr Pro Lys Val Arg Ala
 690 695 700
 Trp Ile Glu Gly Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu
 705 710 715 720
 Thr Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val
 725 730 735
 Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val
 740 745 750
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe
 755 760 765
 Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp
 770 775 780
 Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala
 785 790 795 800
 Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu
 805 810 815
 Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

5 <210> 5
 <211> 830
 <212> PRT

<213> *Thermus* sp.

<220>

<223> ADN polimerasa sps17 de *Thermus* sp. (Sps17)

5

<400> 5

```

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

```

```

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

```

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

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

10 <400> 6

```

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

```

Val 65	Val	Phe	Asp	Ala	Lys 70	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg 75	His	Glu	Ala	Tyr	Glu 80
Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly 85	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro 90	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg 95	Gln
Leu	Ala	Leu	Ile 100	Lys	Glu	Leu	Val	Asp 105	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr 110	Arg	Leu
Glu	Val	Pro 115	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp 120	Asp	Val	Leu	Ala	Thr 125	Leu	Ala	Lys
Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr 140	Ala	Asp	Arg
Asp 145	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val 150	Ser	Asp	Arg	Val	Ala 155	Val	Leu	His	Pro	Glu 160
Gly	His	Leu	Ile 165	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp 170	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu 175	Arg
Pro	Glu	Gln	Trp 180	Val	Asp	Phe	Arg	Ala 185	Leu	Val	Gly	Asp	Pro 190	Ser	Asp
Asn	Leu	Pro 195	Gly	Val	Lys	Gly	Ile 200	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala 205	Leu	Lys	Leu
Leu	Lys 210	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu 215	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys 220	Asn	Leu	Asp	Arg
Val 225	Lys	Pro	Glu	Asn	Val 230	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys 235	Ala	His	Leu	Glu	Asp 240
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu 245	Glu	Leu	Ser	Arg	Val 250	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro 255	Leu
Glu	Val	Asp	Leu 260	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu 265	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly 270	Leu	Arg
Ala	Phe	Leu 275	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe 280	Gly	Ser	Leu	Leu	His 285	Glu	Phe	Gly
Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro 295	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro 300	Trp	Pro	Pro	Pro
Glu 305	Gly	Ala	Phe	Val 310	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg 315	Pro	Glu	Pro	Met	Trp 320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala 325	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg 330	Asp	Gly	Arg	Val	His 335	Arg
Ala	Ala	Asp	Pro 340	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys 345	Asp	Leu	Lys	Glu	Val 350	Arg	Gly
Leu	Leu	Ala 355	Lys	Asp	Leu	Ala	Val 360	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu 365	Gly	Leu	Asp
Leu	Val 370	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro 375	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr 380	Leu	Leu	Asp	Pro
Ser 385	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu 390	Gly	Val	Ala	Arg	Arg 395	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp 400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala 405	His	Arg	Ala	Leu	Leu 410	Ser	Glu	Arg	Leu	His 415	Arg
Asn	Leu	Leu	Lys 420	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu 425	Lys	Leu	Leu	Trp 430	Leu	Tyr	
His	Glu	Val 435	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser 440	Arg	Val	Leu	Ala	His 445	Met	Glu	Ala
Thr	Gly 450	Val	Arg	Arg	Asp	Val 455	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala 460	Leu	Ser	Leu	Glu
Leu 465	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg 470	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu 475	Val	Phe	Arg	Leu	Ala 480
Gly	His	Pro	Phe	Asn 485	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp 490	Gln	Leu	Glu	Arg	Val 495	Leu
Phe	Asp	Glu	Leu 500	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu 505	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys 510	Thr	Gly
Lys	Arg	Ser 515	Thr	Ser	Ala	Ala	Val 520	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg 525	Glu	Ala	His
Pro	Ile 530	Val	Glu	Lys	Ile	Leu 535	Gln	His	Arg	Glu	Leu 540	Thr	Lys	Leu	Lys
Asn 545	Thr	Tyr	Val	Asp	Pro 550	Leu	Pro	Ser	Leu	Val 555	His	Pro	Arg	Thr	Gly 560
Arg	Leu	His	Thr	Arg 565	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala 570	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg 575	Leu
Ser	Ser	Ser	Asp 580	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn 585	Ile	Pro	Val	Arg	Thr 590	Pro	Leu
Gly	Gln	Arg 595	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe 600	Val	Ala	Glu	Ala	Gly 605	Trp	Ala	Leu

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
610 615 620
Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
625 630 635 640
His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val
645 650 655
Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
660 665 670
Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
675 680 685
Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
690 695 700
Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
705 710 715 720
Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
725 730 735
Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
740 745 750
Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
755 760 765
Lys Leu Phe Pro Arg Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
770 775 780
Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
785 790 795 800
Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
805 810 815
Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
820 825 830
Lys Gly

<210> 7

<211> 834

5 <212> PRT

<213> *Thermus caldophilus*

<220>

10 <223> ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

<400> 7

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

Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
225				230						235					240
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu
				245					250					255	
Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
			260					265					270		
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
		275					280					285			
Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro
	290					295					300				
Glu	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp
305					310					315					320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp	Gly	Arg	Val	His	Arg
				325					330					335	
Ala	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Gly
			340					345					350		
Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu	Gly	Leu	Asp
		355					360					365			
Leu	Val	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro
	370					375					380				
Ser	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp
385					390					395					400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	His	Arg
				405					410					415	
Asn	Leu	Leu	Lys	Arg	Leu	Gln	Gly	Glu	Lys	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	
			420					425				430			
His	Glu	Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala
		435					440					445			
Thr	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Glu
	450					455					460				
Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Ala
465					470					475					480
Gly	His	Pro	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu
				485					490					495	
Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly
			500					505					510		
Lys	Arg	Ser	Thr	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Ala	His
		515					520					525			
Pro	Ile	Val	Glu	Lys	Ile	Leu	Gln	His	Arg	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys
	530					535						540			
Asn	Thr	Tyr	Val	Asp	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Val	His	Pro	Asn	Thr	Gly
545					550					555					560
Arg	Leu	His	Thr	Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu
				565					570					575	
Ser	Ser	Ser	Asp	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Thr	Pro	Leu
			580					585					590		
Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe	Val	Ala	Glu	Ala	Gly	Trp	Ala	Leu
		595					600					605			
Val	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	Leu
	610					615					620				
Ser	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ile	Arg	Val	Phe	Gln	Glu	Gly	Lys	Asp	Ile
625					630					635					640
His	Thr	Gln	Thr	Ala	Ser	Trp	Met	Phe	Gly	Val	Pro	Pro	Glu	Ala	Val
				645					650					655	
Asp	Pro	Leu	Met	Arg	Arg	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Val	Leu
			660					665					670		
Tyr	Gly	Met	Ser	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala	Ile	Pro	Tyr
		675					680					685			
Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Phe	Ile	Glu	Arg	Tyr	Phe	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys
	690					695					700				
Val	Arg	Ala	Trp	Ile	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg	Lys	Arg	Gly
705					710					715					720
Tyr	Val	Glu	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Val	Pro	Asp	Leu	Asn
				725					730					735	
Ala	Arg	Val	Lys	Ser	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Met	Ala	Phe	Asn
			740					745					750		
Met	Pro	Val	Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Met	Val
		755					760					765			
Lys	Leu	Phe	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Met	Gly	Ala	Arg	Met	Leu	Leu	Gln
	770					775					780				
Val	His	Asp	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Gln	Ala	Gly	Ala	Glu	Glu	
785					790				795					800	
Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Met	Glu	Lys	Ala	Tyr	Pro	Leu	Ala
			805						810					815	
Val	Pro	Leu	Glu	Val	Glu	Val	Gly	Met	Gly	Glu	Asp	Trp	Leu	Ser	Ala
			820					825					830		
Lys	Gly														

<210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
 <220>
 10 <221> VARIANT
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Ser, Gly, Ala, Asp, Phe, Lys, Cys, Thr o Tyr
 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Glu
 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Phe, Ala, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asp o Lys
 <400> 8
 25
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20
 <210> 9
 <211> 21
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
 <220>
 35 <221> VARIANT
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Glu
 <400> 9
 40
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Phe Asp Glu Leu
 20
 <210> 10
 <211> 21
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
 50 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Ala, Gly, Lys o Arg
 55 <400> 10

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

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

<220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
 <400> 11

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

<210> 12
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17) Z05 DNA polymerase (Z05)
 <400> 12

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

<210> 13
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)
 <400> 13

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

<210> 14
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfil)
 <400> 14

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

<210> 15

<211> 36

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 15

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

<210> 16

15 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> región sintética de dominio de polimerasa de ADN polimerasa Sps17 de *Thermus* sp. (Sps17) Sps17 DNA polymerase (Sps17)

<400> 16

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

25

<210> 17

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

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

<400> 17

35

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

<210> 18

<211> 36

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

45

<400> 18

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

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

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

<400> 19

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

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

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

<400> 20

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

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

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

<400> 21

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

<210> 22

<400> 22
 000

<210> 23
 <211> 36
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

5

<400> 23

```

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

```

10

<210> 24

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

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

<400> 24

```

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

```

20

<210> 25

<211> 36

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

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

30

<400> 25

```

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

```

35

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

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

<220>

<221> VARIANTE

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

45

<223> Xaa = His, Glu o Gln

<220>

<221> VARIANTE

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

50

<223> Xaa = Pro, Thr o Glu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 5 <223> Xaa = Asn o His

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 10 <223> Xaa = Leu o Ile

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 15 <223> Xaa = Asn o Arg

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 20 <223> Xaa = Arg, Pro o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 25 <223> Xaa = Asp, Lys o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 30 <223> Xaa = Leu o Val

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 35 <223> Xaa = Glu, Ser, Ala o Gly

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 40 <223> Xaa = Arg, Asn, Tyr, Thr o Val

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 45 <223> Xaa = Val o Ile

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 50 <223> Xaa = Phe o Tyr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)...(19)
 55 <223> Xaa = Asp o Glu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)...(20)
 60 <223> Xaa = Glu o Lys

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

<400> 27

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

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

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

<400> 28

Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg
 1 5

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

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

<400> 29

Met Lys Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly

Leu	Thr	Thr	20	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	25	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	30	Gly	Phe	Ala
Lys	Ser	35	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	40	Lys	Glu	Asp	Gly	Tyr	45	Lys	Ala	Val	Phe
Val	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	70	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	75	His	Glu	Ala	Tyr	80	Glu
Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	85	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	90	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	95	Gln
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	105	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr	110	Arg	Leu	
Glu	Val	Pro	100	Gly	Phe	Glu	Ala	Asp	120	Val	Leu	Ala	Thr	125	Leu	Ala	Lys	
Lys	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	135	Ser	Asp	Arg	Val	Ile	Leu	140	Thr	Ala	Asp	Arg
Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	150	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	155	Val	Leu	His	Pro	Glu	
Gly	His	Leu	Ile	Thr	165	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	170	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	175	Lys
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	185	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	190	Ser	Asp	
Asn	Leu	Pro	195	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	200	Glu	Lys	Thr	Ala	205	Leu	Lys	Leu	
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys	220	Asn	Leu	Asp	Arg		
Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	230	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	235	Ala	His	Leu	Glu	Asp	240
Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	245	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Asp	Leu	Pro	255	Leu	
Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	265	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	270	Glu	Arg	
Ala	Phe	Leu	275	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	280	Gly	Ser	Leu	Leu	His	285	Phe	Gly	
Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	295	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	300	Val	Lys	Asp	Leu	
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	310	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	315	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe	320
Ala	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asp	Cys	Asp	335	Ile	Pro	
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	345	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	350	Val	Lys	
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	365	Val	Glu	Lys		
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	375	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	380	Ile	Val	Gly	Gln	
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Pro	400	Pro	
Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	410	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	415	Pro	
Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Asp	Asp	425	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	430	Leu	Gly	
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	445	Phe	Pro	Leu		
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	455	Val	Pro	Val	Glu	Lys	460	Ala	Asn	Tyr		
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser	480	Glu	
Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	Ile	495	Val	Tyr	
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	505	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	510	Val	Tyr	
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Glu	Lys	Lys		
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe			
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu	560		

```

      565      570      575
Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Gly Glu His Glu Ile Ile Pro
      580      585
Leu Ile Leu Glu Tyr Arg Lys Ile Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
      595      600
Asp Ala Leu Pro Lys Met Val Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala
      610      615      620
Ser Phe Asn Gln Thr Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp
      625      630      635      640
Pro Asn Leu Gln Asn Leu Pro Thr Lys Ser Glu Glu Gly Lys Glu Ile
      645      650      655
Arg Lys Ala Ile Val Pro Gln Asp Pro Asn Trp Trp Ile Val Ser Ala
      660      665
Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp
      675      680      685
Glu Asn Leu Leu Arg Ala Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu
      690      695      700
Thr Ala Ser Arg Ile Phe Asn Val Lys Pro Glu Glu Val Thr Glu Glu
      705      710      715      720
Met Arg Arg Ala Gly Lys Met Val Asn Phe Ser Ile Ile Tyr Gly Val
      725      730      735
Thr Pro Tyr Gly Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala
      740      745      750
Glu Lys Met Ile Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp
      755      760      765
Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
      770      775      780
Thr Leu Phe Gly Arg Lys Arg Asp Ile Pro Gln Leu Met Ala Arg Asp
      785      790      795      800
Arg Asn Thr Gln Ala Glu Gly Glu Arg Ile Ala Ile Asn Thr Pro Ile
      805      810      815
Gln Gly Thr Ala Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp
      820      825      830
Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met Arg Ser Lys Met Ile Ile Gln Val
      835      840      845
His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Leu
      850      855      860
Val Glu Leu Val Lys Asp Arg Met Thr Asn Val Val Lys Leu Ser Val
      865      870      875      880
Pro Leu Glu Val Asp Val Thr Ile Gly Lys Thr Trp Ser
      885      890

```

<210> 30

<211> 893

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 30

```

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

```

Glu	Val	Pro	100 Gly	Phe	Glu	Ala	Asp	105 Asp	Val	Leu	Ala	Thr	110 Leu	Ala	Lys
Lys	Ala	115 Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	120 Glu	Val	Arg	Ile	Leu	125 Thr	Ala	Asp	Arg
Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	135 Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
Gly	His	Leu	Ile	Thr	150 Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	155 Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	160 Lys
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	200 Glu	Asn	Ile	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	215 Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	220 Ala	His	Leu	Asp
Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	230 Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Asp	Leu	240 Asp
Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	245 Glu	Leu	Ser	Arg	Val	250 Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	255 Leu
Glu	Val	Asp	Phe	Glu	Arg	Arg	Arg	Glu	265 Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	270 Phe
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	280 Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	285 Asp
Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	295 Val	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	300 Ser
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	315 Pro	Phe	Asp	Cys	320 Asp
Ala	Ile	Ala	Leu	Ala	325 Val	Ser	Ser	Leu	Asp	330 Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	335 Ile
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	345 Leu	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	350 Leu
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	360 Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Glu	Val	365 Gly
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	375 Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	380 Glu
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	390 Asp	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	400 Pro
Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	405 Phe	Thr	Met	Ile	Ala	410 Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	415 Glu
Asn	Glu	Lys	Lys	Asn	Leu	Asp	Asp	425 Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Lys	Phe	430 Pro
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	440 Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Asn	445 Tyr
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	455 Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Lys	Thr	Leu	460 Ser
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	470 Ala	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Leu	475 Glu
Leu	Lys	Leu	His	Glu	485 Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	495 Val
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	500 Tyr
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	505 Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	510 Lys
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	520 Ile	Tyr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	525 Phe
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	535 Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	540 Leu
Asn	Gly	Ile	Lys	Arg	550 Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	555 Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	560 Thr
Arg	Ile	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Gly	Glu	His	Glu	Ile	Ile	565 Pro
Leu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ile	600 Asn	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	590 Ile
Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Met	Val	615 Thr	Ala	Pro	Lys	Thr	Gly	Ile	His	605 Ala
Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	630 Leu	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	635 Asp
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	640 Ile

ES 2 564 692 T3

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

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 31

ctacctctg gacccctcca a 21

<210> 32

<211> 25

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

20

<400> 32

ataaccaact ggtagtggcg tgtaa 25

<210> 33

25 <211> 1491

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> synthetic amplicon encoding polymerase domain of Z05 D580G ADN polymerase amplified by error-prone (mutagenic) PCR between BlnI and BglII restriction sites

<400> 33

```

ctacctcctg gacccctcca acaccacccc cgaggggggtg gcccggcgct acggggggga 60
gtggacggag gacgccgccc accggggcct cctcgctgag cggctccagc aaaacctctt 120
ggaacgcctc aagggagagg aaaagctcct ttggctctac caagagggtg aaaagcccct 180
ctcccgggtc ctggcccaca tggaggccac cggggtaagg ctggacgtgg cctatctaaa 240
ggccctttcc ctggagcttg cggaggagat tcgccgcctc gaggaggagg tcttccgcct 300
ggcggggcac ccttcaacc tgaactccc tgaccagcta gagcgggtgc tctttgacga 360
gcttaggctt cccgccctgg gcaagacgca aaagacgggg aagcgctcca ccagcgccgc 420
ggtgctggag gccctcaggg aggccacccc catcgaggag aagatcctcc agcaccggga 480
gctaccaag ctcaagaaca cctacgtaga cccctccccg ggcctcgtcc acccgaggac 540
gggccgcctc cacaccgct tcaaccagac agccacggcc acgggaaggc tctctagctc 600
cgggcccaac ctgcagaaca tccccatccg caccctcttg ggccagagga tccgccgggc 660
cttcgtggcc gaggcgggat gggcggttgg ggccctggac tatagccaga tagagctccg 720
ggtcctcgcc cacctctccg gggacgagaa cctgatcagg gtcttccagg aggggaagga 780
catccacacc cagaccgcaa gctggatgtt cggcgctctc ccggaggccg tggaccccct 840
gatgcgcccg gcggccaaga cgggtgaactt cggcgctctc tacggcatgt ccgcccatag 900
gctctccag gagcttgcca tccccctacg ggaggcgggt gcctttatag agcgctactt 960
ccaaagcttc cccaagggtc gggcctggat agaaaagacc ctggaggagg ggaggaagcg 1020
gggctacgtg gaaaccctct tcggaagaag gcgctacgtg cccgacctca acgcccgggt 1080
gaagagcgtc agggaggccg cggagcgcac ggccttcaac atgcccgtcc agggcaccgc 1140
cgccgacctc atgaagctcg ccatggtgaa gctcttcccc cacttccggg agatgggggc 1200
ccgcatgctc ctccagggtc acgacgagct cctcctggag gccccccaag cgcgggccga 1260
ggaggtggcg gctttggcca aggaggccat ggagaaggcc tatcccctcg ccgtgcccct 1320
ggaggtggag gtggggatcg gggaggactg gctttccgcc aagggtgat atcagatctc 1380
cctgattatg cgtcagtcta tgaagaaaaa tcgtatacag atggacgaag agagaatcct 1440
tgtgaattta acagagggtg tagggattac acgccactac cagttgggta t 1491

```

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

<220>
 <223> polinucleótido diana BRAF V600K de tipo salvaje sintético
 <400> 34

```

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

```

<210> 35
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

```

                                <400> 35
agtaaaaata ggtgattttg gtctagctac aaggaaatct cgatggagtg ggtcccatca 60
gtttgaacag ttgtctggat ccattttgtg gatggtaaga attgaggcta 110

```

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

<400> 36

```

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

```

Val 65	Phe	Asp	Pro	Pro	Val 70	Lys	Thr	Leu	Arg	His	Glu	Gln	Tyr	Glu	Gly
Tyr	Lys	Ser	Gly	Arg 85	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu 90	Asp	Leu	Arg	Gly	Gln 95	Ile
Asn	Arg	Ile	Arg 100	Ala	Leu	Val	Asp	Ala 105	Leu	Gly	Phe	Pro	Arg 110	Leu	Glu
Glu	Pro	Gly 115	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp 120	Val	Ile	Ala	Ser	Leu 125	Thr	Arg	Met
Ala	Glu	Gly 130	Lys	Gly	Tyr	Glu 135	Val	Arg	Ile	Val	Thr 140	Ser	Asp	Arg	Asp
Ala 145	Tyr	Gln	Leu	Leu	Asp 150	Glu	His	Val	Lys	Val 155	Ile	Ala	Asn	Asp	Phe 160
Ser	Leu	Ile	Gly	Pro 165	Ala	Gln	Val	Glu	Glu 170	Lys	Tyr	Gly	Val	Thr 175	Val
Arg	Gln	Trp	Val 180	Asp	Tyr	Arg	Ala	Leu 185	Thr	Gly	Asp	Ala	Ser 190	Asp	Asn
Ile	Pro	Gly 195	Ala	Lys	Gly	Ile	Gly 200	Pro	Lys	Thr	Ala	Ala 205	Lys	Leu	Leu
Gln	Glu	Tyr	Gly	Thr	Leu	Glu 215	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala 220	His	Ala	Gly
Thr 225	Leu	Lys	Pro	Asp	Gly 230	Thr	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu 240
Asn	Val	Lys	Phe	Ser 245	His	Asp	Leu	Ser	Cys 250	Met	Val	Thr	Asp	Leu 255	Pro
Leu	Asp	Ile	Glu	Phe	Gly	Val	Arg	Arg 265	Leu	Pro	Asp	Asn	Pro 270	Leu	Val
Thr	Glu	Asp 275	Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu 280	Leu	His	Ser	Leu 285	Arg	Pro	Met
Ile	Leu	Gly	Leu	Asn	Gly	Pro 295	Glu	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Pro	Asp	Asp
Leu 305	Leu	Glu	Arg	Glu	His	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala 320
Ala	Leu	Pro	Ala	Phe 325	Ser	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Glu	Trp	Gln	Thr	Pro
Ala	Glu	Gly	Ala	Val 340	Trp	Gly	Tyr	Val 345	Leu	Ser	Arg	Glu	Asp 350	Asp	Leu
Thr	Ala	Ala 355	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr 360	Phe	Glu	Asp	Gly 365	Val	Ala	Arg
Pro	Ala	Arg	Val	Ser	Glu	Pro 375	Asp	Glu	Trp	Ala	Gln	Ala	Glu	Ala	Pro
Glu 385	Asn	Leu	Phe	Gly	Glu 390	Leu	Leu	Pro	Ser	Asp 395	Lys	Pro	Leu	Thr	Lys 400
Lys	Glu	Gln	Lys	Ala 405	Leu	Glu	Lys	Ala	Gln	Lys	Asp	Ala	Glu	Lys 415	Ala
Arg	Ala	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Phe	Pro 425	Ala	Thr	Val	Asp	Glu 430	Ala	Glu
Phe	Val	Gly 435	Gln	Arg	Thr	Val	Thr 440	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys 445	Ala	Leu	Ala
Ala	His 450	Leu	Ser	Val	Arg	Gly 455	Thr	Val	Val	Glu	Pro 460	Gly	Asp	Asp	Pro
Leu 465	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu 470	Leu	Asp	Pro	Ala	Asn 475	Thr	Asn	Met	Pro	Val 480
Val	Ala	Lys	Arg	Tyr 485	Leu	Asp	Arg	Glu	Trp 490	Pro	Ala	Asp	Ala	Pro	Thr 495
Arg	Ala	Ala	Ile 500	Thr	Gly	His	Leu	Val 505	Arg	Glu	Leu	Pro	Pro 510	Leu	Leu
Asp	Asp	Ala 515	Arg	Arg	Lys	Met	Tyr 520	Asp	Glu	Met	Glu	Lys 525	Pro	Leu	Ser
Gly	Val 530	Leu	Gly	Arg	Met	Glu 535	Val	Arg	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Ser	Asp
Phe 545	Leu	Gln	Thr	Leu	Ser 550	Ile	Gln	Ala	Gly	Val 555	Arg	Leu	Ala	Asp	Leu 560
Glu	Ser	Gln	Ile	His 565	Glu	Tyr	Ala	Gly	Glu 570	Glu	Phe	His	Ile	Arg 575	Ser
Pro	Lys	Gln	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Tyr 585	Asp	Lys	Leu	Glu	Leu 590	Ala	Ser
Ser	Lys	Lys 595	Thr	Lys	Leu	Thr	Gly 600	Gln	Arg	Ser	Thr	Ala 605	Val	Ser	Ala

Leu Glu Pro Leu Arg Asp Ala His Pro Ile Ile Pro Leu Val Leu Glu
610 615 620
Phe Arg Glu Leu Asp Lys Leu Arg Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Ile Pro
625 630 635 640
Asn Leu Val Asn Pro His Thr Gly Arg Leu His Thr Thr Phe Ala Gln
645 650 655
Thr Ala Val Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Leu Asn Pro Asn Leu Gln
660 665 670
Asn Ile Pro Ile Arg Ser Glu Leu Gly Arg Glu Ile Arg Lys Gly Phe
675 680 685
Ile Ala Glu Asp Gly Phe Thr Leu Ile Ala Ala Asp Tyr Ser Gln Ile
690 695 700
Glu Leu Arg Leu Leu Ala His Ile Ala Asp Asp Pro Leu Met Gln Gln
705 710 715 720
Ala Phe Val Glu Gly Ala Asp Ile His Arg Arg Thr Ala Ala Gln Val
725 730 735
Leu Gly Leu Asp Glu Ala Thr Val Asp Ala Asn Gln Arg Arg Ala Ala
740 745 750
Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu
755 760 765
Ser Asn Asp Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Glu Ala Ala Thr Phe Ile Glu
770 775 780
Ile Tyr Phe Ala Thr Tyr Pro Gly Ile Arg Arg Tyr Ile Asn His Thr
785 790 795 800
Leu Asp Phe Gly Arg Thr His Gly Tyr Val Glu Thr Leu Tyr Gly Arg
805 810 815
Arg Arg Tyr Val Pro Gly Leu Ser Ser Arg Asn Arg Val Gln Arg Glu
820 825 830
Ala Glu Glu Arg Leu Ala Tyr Asn Met Pro Ile Gln Gly Thr Ala Ala
835 840 845
Asp Ile Met Lys Leu Ala Met Val Gln Leu Asp Pro Gln Leu Asp Ala
850 855 860
Ile Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu Leu Ile Glu
865 870 875 880
Ala Pro Leu Asp Lys Ala Glu Gln Val Ala Ala Leu Thr Lys Lys Val
885 890 895
Met Glu Asn Val Val Gln Leu Lys Val Pro Leu Ala Val Glu Val Gly
900 905 910
Thr Gly Pro Asn Trp Phe Asp Thr Lys
915 920

<220>

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

5

<210> 37

<211> 892

<212> PRT

<213> Thermosipho africanus

10

<220>

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

<400> 37

15

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

Val	130	Ser	Asp	Lys	Val	135	Phe	Val	Trp	Arg	Val	140	Glu	Arg	Gly	Ile	Thr	Asp
145						150	Arg	Asn	Lys	Val	155	Glu	Lys	Tyr	Gly	Ile	160	Tyr
Leu	Val	Leu	Tyr	Asp	165	Lys	Asp	Tyr	Leu	Ser	170	Leu	Val	Gly	Asp	Gln	Ile	Asp
Pro	Glu	Gln	Phe	180	Lys	Val	Lys	Gly	Ile	200	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Val	Ser	Leu
Asn	Ile	Pro	195	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	215	Glu	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	Ile	Asn	Leu
Leu	Lys	Lys	Tyr	Asn	Ser	Leu	230	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp	Leu	240
Leu	Thr	Glu	Lys	Leu	245	Glu	Leu	Val	Glu	Leu	Ile	250	Tyr	Asp	Val	Pro	Met	Asp
Gln	Lys	Ser	Ile	260	Glu	Ile	Ile	Tyr	Arg	265	Gly	Tyr	Asn	Pro	Asp	Lys	Leu	270
Val	Glu	Lys	Asp	275	Leu	Lys	Lys	Tyr	Glu	280	Phe	Ser	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Leu
Leu	Lys	Val	Gln	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Tyr	Ile	Leu	Val	Asp	Asn	Glu		
Asn	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Glu	295	Ala	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Lys	Thr	Phe	
Asp	305	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	310	Ala	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Lys	Thr	Phe	
Ser	Ile	Asp	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Leu	Asp	330	Gly	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro	
Val	Gly	Ile	Ser	340	Ile	Ser	Thr	Met	Glu	345	Gly	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Lys
Val	Ser	His	Phe	Gly	Ala	Lys	Asn	Ile	Ser	Lys	Ser	Leu	Ile	Asp	Lys			
Phe	Leu	Lys	Gln	Ile	Leu	Gln	375	Glu	Lys	Asp	Tyr	Asn	Ile	Val	Gly	Gln		
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ile	Phe	Lys	Ser	Met	Gly	Phe	Ser	Pro			
385							390	Thr	Met	Ile	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asn	Pro		
Asn	Val	Pro	His	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	410	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asn	Pro		
Asp	Glu	Lys	Arg	Phe	Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	Tyr	Leu	Gly			
Tyr	Lys	Met	Ile	Ser	Phe	Asp	Glu	Leu	Val	Asn	Glu	Asn	Val	Pro	Leu			
Phe	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Glu	Arg	Ala	Val	Glu	Tyr			
Ser	450	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Val	Thr	Tyr	Arg	Ile	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly		
465							470	Thr	Tyr	Arg	Ile	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly		
Arg	Lys	Ile	Tyr	Glu	Asn	Glu	Met	Glu	Lys	Leu	Phe	Tyr	Glu	Ile	Glu			
Met	Pro	Leu	Ile	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Tyr			
Phe	Asp	Glu	Glu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Lys	Tyr	Gln	Glu	Lys			
Met	530	Asp	Gly	Ile	Lys	Glu	Lys	Val	Phe	Glu	Ile	Ala	Gly	Glu	Thr	Phe		
Asn	Leu	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Val	Ala	Tyr	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu			
545							550	Gln	Val	Ala	Tyr	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu	
Asn	Ile	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Thr	Ala	Thr	Gly	Lys	Phe	Ser	Thr	Asn			
Ala	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	His	Glu	Ile	Ala	Lys	Leu			
Leu	Leu	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile	Asp			
Ser	Ile	Pro	Leu	Ser	Ile	Asn	Arg	Lys	Thr	Asn	Arg	Val	His	Thr	Thr			
610							615	Arg	Lys	Thr	Asn	Arg	Val	His	Thr	Thr		
Phe	His	Gln	Thr	Gly	Thr	Ser	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro			
625							630	Thr	Arg	Ser	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile	Arg		
Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Arg	Ser	Glu	650	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile	Arg		
Lys	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Arg	Gln	Asp	Trp	Trp	Ile	Leu	Gly	Ala	Asp			
Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	Val	Ser	Lys	Asp	Glu			

```

        675          680          685
Asn Leu Leu Lys Ala Phe Lys Glu Asp Leu Asp Ile His Thr Ile Thr
   690          695          700
Ala Ala Lys Ile Phe Gly Val Ser Glu Met Phe Val Ser Glu Gln Met
   705          710          715
Arg Arg Val Gly Lys Met Val Asn Phe Ala Ile Ile Tyr Gly Val Ser
        725          730          735
Pro Tyr Gly Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu Thr Lys
        740          745          750
Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr
        755          760          765
Leu Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr
        770          775          780
Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Leu Arg Ser Lys Asn Gly
   785          790          795
Asn Arg Val Gln Glu Gly Glu Arg Ile Ala Val Asn Thr Pro Ile Gln
        805          810          815
Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ile Ala Met Ile Asn Ile His Asn
        820          825          830
Arg Leu Lys Lys Glu Asn Leu Arg Ser Lys Met Ile Leu Gln Val His
        835          840          845
Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Asn Glu Leu Glu Ile Val Lys
   850          855          860
Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro
   865          870          875
Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu
        885          890

```

<210> 38

<211> 893

<212> PRT

5 <213> *Thermotoga maritima*

<220>

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

10 <400> 38

```

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

```

Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Glu	Thr	Asn	Val	Pro	Ile	Glu	Ile
				245					250					255	
Asn	Trp	Glu	Glu	Leu	Arg	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Leu
			260					265					270		
Pro	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Phe	Ala	Ser	Ile	Met	Lys	Glu	Leu	Gln
		275					280					285			
Leu	Tyr	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	Asp	Leu
	290					295					300				
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe
305					310					315					320
Ala	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asp	Cys	Asp	Ile
				325					330					335	
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro
			340					345					350		
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Lys
		355					360					365			
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Val	Gly	Gln
	370					375					380				
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Pro
385					390					395					400
Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Pro
				405					410					415	
Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly
			420					425					430		
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Pro	Leu
		435					440					445			
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Ala	Asn	Tyr
	450					455					460				
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser
465					470					475					480
Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	Ile	Glu
				485					490					495	
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Tyr
			500					505					510		
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys
		515					520					525			
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe
	530					535					540				
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu
545					550					555					560
Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr
				565					570					575	
Arg	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Gly	Glu	His	Glu	Ile	Ile	Pro
			580					585					590		
Leu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile
		595					600					605			
Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Met	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Ile	His	Ala
	610					615					620				
Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
625					630					635					640
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile
				645					650					655	
Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Pro	Asn	Trp	Trp	Ile	Val	Ser	Ala
			660					665					670		
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp
		675					680					685			
Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	His	Thr	Leu
	690					695					700				
Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Phe	Asn	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Glu
705					710					715					720
Met	Arg	Arg	Ala	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val
				725					730					735	
Thr	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Lys	Glu	Ala
			740					745					750		
Glu	Lys	Met	Ile	Val	Asn	Tyr	Phe	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Asp
		755					760					765			
Tyr	Ile	Gln	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg
	770					775					780				

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

<210> 39

<211> 893

<212> PRT

5 <213> Thermotoga neopolitana

<220>

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

10 <400> 39

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

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

<210> 40
 <211> 876
 <212> PRT

<213> *Bacillus stearothermophilus*

<220>

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

<400> 40

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

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

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

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

10 <400> 41
 Met Lys Lys Lys Leu Val Leu Ile Asp Gly Ser Ser Val Ala Tyr Arg
 1 5 10 15
 Ala Phe Phe Ala Leu Pro Leu Leu His Asn Asp Lys Gly Ile His Thr

Asn	Ala	Val	20	Tyr	Gly	Phe	Thr	Met	25	Met	Leu	Asn	Lys	Ile	30	Leu	Ala	Glu
Glu	Glu	35	Pro	Thr	His	Met	Leu	40	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	45	Gly	Lys	Thr	Thr
Phe	Arg	His	Glu	Ala	Phe	Gln	Glu	55	Tyr	Lys	Gly	Gly	Arg	Gln	Gln	Thr	80	
65	Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	85	Glu	Gln	Phe	Pro	Leu	90	Leu	Arg	Glu	Leu	95	Arg
Ala	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Tyr	Glu	105	Leu	Glu	Asn	Tyr	Glu	Ala	110	Asp	Asp	
Ile	Ile	Gly	100	Thr	Leu	Ala	Ala	Arg	120	Glu	Gln	Glu	Gly	125	Phe	Glu	Val	
Lys	Val	115	Ile	Ser	Gly	Asp	Arg	135	Asp	Leu	Thr	Gln	Leu	140	Ala	Ser	Pro	His
Val	Thr	Val	130	Asp	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	155	Glu	Pro	Tyr	160
Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	175	Gln	Ile		
Val	Asp	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	Ser	Asp	Asn	Ile	190	Pro	Gly		
Val	Pro	Gly	180	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	200	Ala	Val	Lys	Leu	205	Arg	Gln	Phe	
Gly	Thr	Val	195	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Glu	Ile	220	Lys	Gly	Glu	
Lys	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	His	Arg	Glu	235	Met	Ala	Leu	Leu	Ser	240	
Lys	Lys	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	255	Ser	Leu		
Asp	Asp	Ile	Ala	245	Tyr	Gln	Gly	Glu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	270	Ala	Leu		
Phe	Lys	Glu	Leu	Gly	Phe	Gln	Ser	280	Phe	Leu	Glu	Lys	Met	285	Glu	Ser	Pro	
Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Pro	295	Leu	Ala	Lys	Met	Ala	300	Phe	Thr	Leu	Ala	
Asp	Arg	Val	Thr	Glu	Glu	Met	Leu	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	315	Val	Val	320	
Glu	Val	Val	Glu	Glu	Asn	Tyr	His	Asp	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	335	Ile	Ala		
Val	Val	Asn	Glu	His	Gly	Arg	Phe	345	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	350	Ala	Leu		
Ala	Asp	Pro	Gln	Phe	Val	Ala	Trp	360	Gly	Asp	Glu	Thr	Lys	365	Lys	Lys		
Ser	Met	Phe	Asp	Ser	Lys	Arg	Ala	375	Ala	Val	Ala	Leu	Lys	380	Trp	Lys	Gly	
Ile	Glu	Leu	Cys	Gly	Val	Ser	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	395	Tyr	Leu	400	
Leu	Asp	Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Asp	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	410	Lys	Met		
Lys	Gln	Tyr	Glu	Ala	Val	Arg	Pro	Asp	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	425	Lys	Gly		
Ala	Lys	Arg	Ala	Val	Pro	Asp	Glu	440	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	445	His	Leu	Val	
Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	455	Leu	Glu	Arg	Pro	Phe	460	Leu	Asp	Glu	
Leu	Arg	Arg	Asn	Glu	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	475	Gln	Pro	480	
Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Ala	Glu	Met	Glu	Phe	Ala	Gly	Val	Lys	490	Val	Asp		
Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Gly	Glu	505	Glu	Leu	Ala	Glu	510	Gln	Leu	Arg	
Thr	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	Tyr	Glu	520	Leu	Ala	Gly	Gln	Glu	525	Phe	Asn	Ile	
Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Gly	Val	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu	540	Gln	Leu		
Pro	Val	Leu	Lys	Lys	Ser	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ala	555	Asp	Val	560	
Leu	Glu	Lys	Leu	Ala	Pro	Tyr	His	Glu	Ile	Val	Glu	Asn	Ile	Leu	Gln			

His	Tyr	Arg	Gln	565	Leu	Gly	Lys	Leu	Gln	570	Ser	Thr	Tyr	Ile	Glu	575	Gly	Leu
Leu	Lys	Val	Val	580	Arg	Pro	Asp	Thr	Lys	585	Lys	Val	His	Thr	Ile	Phe	Asn	
Gln	Ala	595	Leu	Thr	Gln	Thr	Gly	600	Leu	Ser	Ser	Thr	605	Glu	Pro	Asn	Leu	
Gln	Asn	Ile	Pro	Ile	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Arg	Lys	Ile	Arg	Gln	Ala	640		
625	Phe	Val	Pro	Ser	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ile	Phe	Ala	Ala	Asp	Tyr	Ser		
Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	His	650	Ile	Ala	Glu	Asp	Asp	Asn	Leu		
Met	Glu	Ala	660	Phe	Arg	Arg	Asp	Leu	665	Asp	Ile	His	Thr	Lys	Thr	Ala	Met	
Asp	Ile	675	Phe	Gln	Val	Ser	Glu	Asp	680	Glu	Val	Thr	Pro	Asn	Met	Arg	Arg	
Gln	Ala	Lys	Ala	Val	Asn	710	Phe	Gly	Ile	Val	Tyr	Gly	Ile	Ser	Asp	Tyr		
705	Gly	Leu	Ala	Gln	Asn	725	Leu	Asn	Ile	Ser	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Phe	
Ile	Glu	Arg	Tyr	740	Phe	Glu	Ser	Phe	Pro	745	Gly	Val	Lys	Arg	Tyr	Met	Glu	
Asn	Ile	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	760	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr	Leu	Leu		
His	Arg	770	Arg	Arg	Tyr	Leu	Pro	Asp	Ile	Thr	Ser	Arg	780	Asn	Phe	Asn	Val	
Arg	Ser	Phe	Ala	Glu	Arg	Met	Ala	Met	Asn	Thr	Pro	Ile	Gln	Gly	Ser			
785	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Lys	Ala	Met	Ile	Asp	Leu	Asn	Ala	Arg	Leu		
Lys	Glu	Glu	Arg	805	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	810	Leu	Gln	Val	His	Asp	Glu		
Leu	Ile	Leu	Glu	820	Ala	Pro	Lys	Glu	825	Glu	Met	Glu	Arg	Leu	Cys	Arg	Leu	
Val	Pro	Glu	Val	835	Met	Glu	Gln	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Lys		
Val	850	Asp	Tyr	His	Tyr	Gly	855	Ser	Thr	Trp	Tyr	Asp	860	Ala	Lys			
865						870						875						

<210> 42

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

<220>

<221> VARIANTE

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

15 <223> Xaa = His, Glu o Gln

<220>

<221> VARIANTE

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

20 <223> Xaa = Pro, Thr o Glu

<220>

<221> VARIANTE

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

25 <223> Xaa = Asn o His

<220>

<221> VARIANTE

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

30 <223> xaa = Leu o Ile

<220>

<221> VARIANTE

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

35 <223> Xaa = Asn o Arg

<220>

<221> VARIANTE

- <222> (9)...(9)
<223> Xaa = any amino acid
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Arg, Pro o Ser
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)...(11)
<223> Xaa = Asp, Lys o Thr
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)...(13)
<223> Xaa = Leu o Val
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)...(14)
<223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Glu, ser, Ala o Gly
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (15)...(15)
<223> Xaa = Arg, Asn, Tyr, Thr o Val
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = Val o Ile
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (18)...(18)
<223> Xaa = any amino acid
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (19)...(19)
<223> Xaa = Asp o Glu
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (20)...(20)
<223> Xaa = Glu o Lys
- 50 <400> 42
Ala Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Leu Xaa Xaa Xaa Leu
20
- 55 <210> 43
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)...(3)

<223> Xaa = His o Glu

<220>
<221> VARIANTE
5 <222> (7)...(7)
<223> Xaa = Leu o Ile

<220>
<221> VARIANTE
10 <222> (9)...(9)
<223> Xaa = any amino acid

<220>
<221> VARIANTE
15 <222> (10)...(10)
<223> Xaa = Arg o Pro

<220>
<221> VARIANTE
20 <222> (11)...(11)
<223> Xaa = Asp o Lys

<220>
<221> VARIANTE
25 <222> (13)...(13)
<223> Xaa = Leu o Val

<220>
<221> VARIANTE
30 <222> (14)...(14)
<223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Glu o Ser

<220>
<221> VARIANTE
35 <222> (15)...(15)
<223> Xaa = Arg o Asn

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> (16)...(16)
<223> Xaa = Val o Ile

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

<220>
<221> VARIANTE
50 <222> (19)...(19)
<223> Xaa = Asp o Glu

<220>
<221> VARIANTE
55 <222> (20)...(20)
<223> Xaa = Glu o Lys

<400> 43

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

<210> 44
<211> 21

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = His o Glu

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Leu o Ile

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)...(10)
 <223> Xaa = Arg o Pro

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp o Lys

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Leu o Val

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Glu o Ser

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Asp o Glu

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = Glu o Lys

<400> 44
 Ala Gly Xaa Pro Phe Asn Xaa Asn Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Leu Phe Xaa Xaa Leu
 20

55 <210> 45
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (9)...(9)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> xaa = cualquier aminoácido

<400> 45
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

15 <210> 46
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> xaa = cualquier aminoácido diferente de Ser

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Glu

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido diferente de Phe

40 <400> 46
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20

45 <210> 47
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Ser, Gly, Ala, Asp, Phe, Lys, Cys, Thr o Tyr

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

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Phe, Ala, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asp o Lys
 5 <400> 47

 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20
 <210> 48
 <211> 21
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Ser, Gly, Ala, Asp, Phe, Lys, Cys, Thr o Tyr
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Phe, Ala, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asp o Lys
 25
 <400> 48
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Lys Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20
 <210> 49
 <211> 21
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> xaa = ser, Gly, Ala, Asp, Phe, Lys, Cys, Thr o Tyr
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Arg, Lys, Ala o Gly
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = Phe, Ala, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asp o Lys
 50
 <400> 49
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Xaa Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Xaa Asp Glu Leu
 20
 <210> 50
 <211> 21
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Arg, Lys, Ala o Gly

<400> 50
 Ala Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Xaa Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Phe Asp Glu Leu
 20

10

<210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo de dominio de ADN polimerasa sintética

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Ser o Thr

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Leu, Gly, Thr, Gln, Ala, ser, Asn, Arg o Lys

30 <400> 51
 Thr Gly Arg Leu Ser Ser Xaa Xaa Pro Asn Leu Gln Asn
 1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. ADN polimerasa que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 o a SEC ID nº 2 y que presenta una actividad de discriminación de no correspondencias 3' en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que la ADN polimerasa comprende un motivo en el dominio de polimerasa que comprende:
A-G-H-P-F-N-L-N-S-R-D-Q-L-X₁₀-R-V-L-F-D-E-L, en el que:
X₁₀ es A, G, K o R (SEC ID nº 10), en el que la ADN polimerasa de control presenta la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido X₁₀ de la ADN polimerasa de control es E.
- 10 2. ADN polimerasa según la reivindicación 1, que comprende además un motivo que comprende:
T-G-R-L-S-S-X₇-X₈-P-N-L-Q-N, en el que:
X₇ es Ser (S) o Thr (T), y
X₈ es cualquier aminoácido diferente de D o E (SEC ID nº 27).
- 15 3. ADN polimerasa según la reivindicación 2, en la que el aminoácido correspondiente a la posición X₈ se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K (SEC ID nº 51).
- 20 4. ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la polimerasa presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, respecto a la SEC ID nº 1.
- 25 5. ADN polimerasa según la reivindicación 4, en la que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 de la SEC ID nº 1 se selecciona de entre el grupo que consiste de L, G, T, Q, A, S, N, R y K.
6. ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*.
7. ADN polimerasa según la reivindicación 6, en la que X₁₀ es K.
- 30 8. Ácido nucleico recombinante codificante de la ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante según la reivindicación 8.
- 35 10 Método para llevar a cabo la extensión de cebadores, que comprende:
poner en contacto una ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con un cebador, un molde polinucleótido y nucleósidos trifosfato bajo condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de esta manera un cebador extendido.
- 40 11. Kit para producir un cebador extendido, que comprende:
por lo menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Kit según la reivindicación 11, que comprende además uno o más recipientes adicionales seleccionado de entre el grupo que consiste de:
- 45 (a) un recipiente que proporciona un cebador hibridable, bajo condiciones de extensión de cebadores, con un molde polinucleótido predeterminado,
(b) un recipiente que proporciona nucleósidos trifosfato, y
(c) un recipiente que proporciona un tampón adecuado para la extensión de cebadores.
- 50 13. Mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, por lo menos un cebador, un molde polinucleótido y nucleósidos trifosfato.

FIGURA 1

Z05	EEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E IRLPALGKT	(SEC ID n° 12)
Taq	EAEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPAIGKT	(SEC ID n° 13)
Tfi	EAEVHRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPPIGKT	(SEC ID n° 14)
Tfl	EEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPAIGKT	(SEC ID n° 15)
Sps17	EAEVHRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E LGLPPIGKT	(SEC ID n° 16)
Tth	EEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E IRLPALGKT	(SEC ID n° 17)
Tca	EEVFRLAGH P FN L N S R D Q L E R V L F D E IRLPALGKT	(SEC ID n° 18)
Tma	AEEIYRIAGE P FN I N S P K Q V S R I L F E K LGIKPRGKT	(SEC ID n° 19)
Tne	AEKIYQIAGE P FN I N S P K Q V S N I L F E K LGIKPRGKT	(SEC ID n° 20)
Taf	KEKVFEIAGE T FN L N S S T Q V A Y I L F E K INIAPY-KK	(SEC ID n° 21)
Dra	ESQIHEYAGE E FH I R S P K Q L E T V L Y D K DELASSKKT	(SEC ID n° 23)
Bst	ERRIYELAGQ E FN I N S P K Q L G T V L F D K LQLPVLKKT	(SEC ID n° 24)
Bca	EQRIYELAGQ E FN I N S P K Q L G V I L F E K LQLPVLKKS	(SEC ID n° 25)
	-----AGX ₁ X ₂ FX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ QX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ LX ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ L-----	(SEC ID n° 26)

FIGURA 2

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