

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 103**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14165903 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2813576**

54 Título: **Mutantes de ADN polimerasa de phi29 que tienen mayor termoestabilidad y capacidad de procesamiento que comprenden M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L**

30 Prioridad:

**25.04.2013 US 201361815893 P**

**20.12.2013 US 201314135860**

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

**20.07.2016**

73 Titular/es:

**THERMO FISHER SCIENTIFIC BALTICS UAB**

**(100.0%)**

**V.A. Graiciuno 8**

**02241 Vilnius, LT**

72 Inventor/es:

**POVILAITIS, TADAS y**

**SKIRGAILA, REMIGIJUS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 578 103 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

**Mutantes de ADN polimerasa de phi29 que tienen mayor termoestabilidad y capacidad de procesamiento que comprenden M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L**

5 Mutantes y métodos que utilizan tales mutantes, de ADN polimerasa del bacteriófago phi29 (mutantes de ADN polimerasa de phi29). Tales mutantes tienen mayor termoestabilidad y dan como resultado mayor capacidad de procesamiento.

10 La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 es una enzima monomérica de 66 kDa, una replicasa dependiente de ADN cebada con proteína perteneciente a la familia de ADN polimerasas de tipo eucariótico (familia B) (Bernad et al., 1987). Al igual que otras ADN polimerasas, lleva a cabo la síntesis de ADN mediante la adición de nucleótidos al grupo 3'-OH de la cadena de ADN en crecimiento con valores de discriminación de la inserción que oscilan de  $10^4$  a  $10^6$  (Esteban et al., 1993). Contiene un dominio exonucleasa que cataliza la exonucleólisis 3' → 5' de nucleótidos emparejados erróneamente. Esta característica de corrección de pruebas mejora la fidelidad de replicación  $10^2$  veces (Esteban et al., 1994).

20 La ADN polimerasa de phi29 tiene características funcionales distintivas en comparación con otras replicasas. (1) *In vivo*, puede iniciar la síntesis de ADN mediante la adición de dAMP al grupo hidroxilo de la Ser<sup>232</sup> de la proteína terminal (PT) de fagos (Salas y da Vega 2006). (2) A diferencia de la mayoría de replicasas que se basan en proteínas accesorias que se van a unir de forma estable al ADN, la propia ADN polimerasa de phi29 tiene muy fuerte capacidad de unión a ADN de hebra sencilla, y lleva a cabo la síntesis de ADN sin factores de capacidad de procesamiento, lo que representa la capacidad de procesamiento más alta conocido (>70 kb) entre otras ADN polimerasas (Blanco et al., 1989). (3) Desenrolla la hélice de ADN parental, utilizando la energía de escisión de dNTP para la polimerización de ADN que acompaña el desenrollamiento del ADN y que le permite replicar el genoma de doble hebra sin ninguna proteína desenrolladora.

30 En comparación con la estructura de otras ADN polimerasas de la familia B, la ADN polimerasa de phi29 muestra subdominios palma, pulgar y los dedos que contienen pliegues (mano derecha) comunes (Kamtekar et al., 2004). La principal diferencia estructural entre la ADN polimerasa de phi29 y las ADN polimerasas de la familia B es la presencia de dos subdominios adicionales, llamados TPR1 y TPR2 que son inserciones entre los subdominios dedos y palma (Dufour et al., 2000). El TPR2 ayuda a formar un túnel estrecho alrededor del ADN aguas abajo, forzando la separación de la segunda hebra antes de su entrada al sitio activo de la polimerasa (Rodríguez et al. 2005). Adicionalmente palma, pulgar, TPR1, y TPR2 forman una estructura en forma de rosquilla alrededor del producto dúplex aguas arriba, proporcionando máxima estabilidad de unión a ADN que potencialmente mejora la capacidad de procesamiento de una manera análoga a las proteínas abrazadera deslizante (Berman et al. 2007). Tal peculiaridad estructural proporciona alta capacidad de procesamiento y actividad de desplazamiento de la hebra que permite que la ADN polimerasa de phi29 sea utilizada en la amplificación de desplazamiento múltiple isotérmica (MDA) (Dean et al. 2002), o la amplificación por círculo rodante (RCA) (Lizardi et al. 1998).

40 Las tecnologías de amplificación basadas en ADN polimerasa de phi29 tienen varias ventajas en comparación con los métodos amplificación de ADN por PCR clásicos. Cualquier muestra de ADN se puede amplificar, porque no se requiere información de la secuencia; en su lugar, se utilizan cebadores hexaméricos aleatorios para la iniciación de la síntesis de ADN. Los amplicones sintetizados por la ADN polimerasa de phi29 pueden ser mucho más grande en comparación con los obtenidos mediante PCR. Las reacciones de amplificación de ADN isotérmicas no requieren equipo especial de laboratorio tales como termocicladores. Estas ventajas hacen que la ADN polimerasa de phi29 sea adecuada para la detección y el análisis de genomas virales circulares conocidos y desconocidos (Johnes et al. 2009), la replicación de plásmidos patógenos (Hutchison et al. 2005), la amplificación de muestras muy pequeñas de ADN, p. ej., la replicación de muestras puntuales de sangre en papel de filtro, y para la descripción de nuevos metagenomas. La capacidad de utilizar pequeñas muestras de ADN circulares (sondas candado) se puede aplicar para la generación de nanomoldes de ADN periódicos (Simmel et al. 2005) o la detección de ARN (Lagunavicius et al. 2010). La alta capacidad de procesamiento, la fuerte actividad de desplazamiento de la hebra, y la alta precisión permiten que la enzima amplifique los genomas completos con sesgo de amplificación o pérdida del alelo mínimos (Lasken et al. 2003; Weissman et al. 2008) en comparación con los métodos de amplificación del genoma completo basados en PCR (WGA), tal como polimerización degenerada de oligonucleótidos (DOP-PCR) o la reacción de polimerización por extensión del cebador (PEP-PCR). La estabilidad de los complejos de ADN polimerasa de phi29-ADN hace que la ADN polimerasa de phi29 sea atractiva para las técnicas de una sola molécula. Los complejos ADN polimerasa de phi29-ADN son estables cuando se capturan en un campo eléctrico a través de nanoporos de  $\alpha$ -hemolisina, y se pueden utilizar para estudiar el ácido nucleico mediante su extracción a través del lumen de los nanoporos durante la replicación (Akeson et al. 2010).

60 Para aplicaciones tales como las descritas, la capacidad de realizar reacciones a temperatura elevada sería ventajosa para que la cinética de la reacción de amplificación fuera más rápida. La ADN polimerasa de phi29 es una enzima mesófila típica con una temperatura óptima de reacción de 30°C. Una temperatura de reacción de 30°C

puede causar problemas durante la amplificación de ADN con alto contenido de G/C. Las temperaturas de reacción elevadas podrían mejorar la eficiencia de amplificación de ADN y disminuir la formación de productos de reacción no específicos, independientes del molde en la reacción de amplificación del genoma completo (WGA) (Alsmadi et al. 2009). La temperatura de trabajo de 30°C relativamente baja de la ADN polimerasa de phi29 limita su aplicación; se podría utilizar una enzima más termoestable en muchas más técnicas de amplificación de ADN, generar más producto, funcionar más rápido, y aumentar la sensibilidad de la reacción de amplificación.

Se realizaron intentos para mejorar las características de la ADN polimerasa de phi29. Se insertaron mutaciones de aminoácidos, o la ADN polimerasa de phi29 se fusionó con motivos de unión a ADN (de Vega et al. 2010). En la determinación de la secuencia de bases de nucleótidos de una molécula de ADN, se utilizó ADN polimerasa de phi29 no natural en el que el radical de aminoácido en la posición 12, 14, o 16 de la polimerasa fue remplazado por alanina, lo que dio como resultado la reducción de la actividad exonucleasa, conservando la actividad de la ADN polimerasa sin cambios (Patente de Estados Unidos Núm. 5.198.543). Se describen reactivos y modificaciones de la ADN polimerasa de phi29 que aumentan los tiempos de residencia para los análogos de nucleótidos, para su uso en operaciones analíticas tales como el análisis y la determinación de la secuencia de ácido nucleico (EP2089517A2). Se generó una ADN polimerasa de phi29 modificada para obtener la incorporación más eficiente de los nucleótidos marcados utilizados para generar la señal de FRET en la incorporación (WO2009091847A2). Típicamente, el donador de FRET se conecta a la polimerasa, y el aceptor de FRET se ancla al nucleótido entrante. La emisión de FRET se produce cuando la polimerasa se une al nucleótido entrante y el donador de FRET se pone en estrecha proximidad con el aceptor de FRET. Los nucleótidos incorporados pueden ser identificados mediante el espectro de emisión del aceptor de FRET. Tal estrategia se puede utilizar en la reacción de secuenciación de una sola molécula. Se describió una ADN polimerasa de phi29 modificada con mayor resistencia al fotodaño (Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2010009355); el método cambió radicales de aminoácidos susceptibles de fotodaño por aminoácidos menos sensibles. La resistencia al fotodaño es muy importante en sistemas de análisis que utilizan marcadores ópticos, p. ej., reacción de secuenciación de una sola molécula. La exposición prolongada de los reaccionantes químicos y bioquímicos a energía de radiación durante la excitación y la detección de marcadores ópticos puede dañar la polimerasa mediante la oxidación de los radicales de aminoácidos sensibles.

La presente invención proporciona una DNA-polimerasa del bacteriófago phi29 que comprende una mutación M8R, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 tiene mayor estabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje, y, opcionalmente, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende adicionalmente al menos una mutación seleccionada entre V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para amplificar un ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo el método poner en contacto el ADN que va a ser amplificado una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 que comprende una mutación M8R, e incubar la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante y ADN en condiciones para dar lugar un ADN amplificado, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 tiene mayor estabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje, y, opcionalmente, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende adicionalmente al menos una mutación seleccionada entre V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.

Los mutantes de la ADN polimerasa de phi29 la invención tienen mayor estabilidad de proteínas y una mayor vida media, en comparación con ADN polimerasa de tipo salvaje. Son más estables en mezclas de reacción con o sin ADN. Los mutantes de ADN polimerasa de phi29 de la invención generan más producto de amplificación. Los mutantes de ADN polimerasa de phi29 de la invención amplifican el ADN genómico con menos sesgo en comparación con la ADN polimerasa de tipo salvaje.

Se proporciona adicionalmente una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.

También se proporciona un ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 10 con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L, opcionalmente en donde la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende una o más mutaciones adicionales, siempre que la secuencia de aminoácidos conserve al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95 %, o al menos 98% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 10.

La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención tiene mejores propiedades funcionales en comparación con ADN polimerasa de tipo salvaje.

En particular, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención puede tener mayor termoestabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

Además o alternativamente, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención puede producir una mayor cantidad de producto de amplificación de ADN en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

5 Además o alternativamente, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención puede tener una vida media más larga en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje. Preferiblemente, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 exhibe la vida media más larga en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje a 37°C y/o a 40°C. Más preferiblemente, la vida media es al menos 1½ veces, incluso más preferiblemente al menos dos veces más larga, en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

10 Además o alternativamente, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención puede tener una mayor afinidad por el ADN en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

15 Además o alternativamente, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención puede tener un mayor grado de fidelidad de la ADN polimerasa en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

Además o alternativamente, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención puede presentar un aumento de catálisis en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

20 Las comparaciones con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje mencionada anteriormente se pueden realizar utilizando ensayos conocidos en la técnica. En particular, la comparación se puede realizar utilizando los métodos establecidos en los Ejemplos. Por ejemplo, la vida media de la enzima polimerasa se puede medir para evaluar la termoestabilidad de las proteínas (p. ej. de acuerdo con el Ejemplo 2), la eficacia de la reacción mediante amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) se puede evaluar para determinar la estabilidad de la polimerasa en mezclas de reacción, la actividad a temperaturas elevadas y la cantidad de producto de amplificación generado (por ejemplo de acuerdo con el ejemplo 3), el sesgo de la amplificación se puede determinar mediante la secuenciación de los productos de amplificación del genoma completo obtenido utilizando la ADN polimerasa de phi29 (p. ej., de acuerdo con el ejemplo 4), y se puede utilizar análisis de cambio de movilidad electroforética para determinar que la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la invención tiene mayor afinidad por el sustrato en comparación con la de tipo salvaje (p. ej., de acuerdo con el Ejemplo 5).

25 Preferiblemente, la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje referida en la presente memoria y utilizada para la comparación tiene el SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, la mejora de las propiedades funcionales es a 37°C y/o a 40°C.

35 De acuerdo con la descripción al menos una mutación mencionada anteriormente puede ser al menos dos mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L. Las al menos dos mutaciones pueden ser M8R y V51A. Alternativamente, las al menos dos mutaciones pueden ser:

- 40 (A) M8R y al menos una mutación seleccionada entre V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L;  
 (B) V51A y al menos una mutación seleccionada entre M8R, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L;  
 45 (C) M97T y al menos una mutación seleccionada entre M8R, V51A, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L;  
 (D) G197D y al menos una mutación seleccionada entre M8R, V51A, M97T, L123S, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L;  
 50 (E) E221K y al menos una mutación seleccionada entre M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.

55 La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la invención puede comprender las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, y E221K. En otras palabras, la al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L puede ser M8R, V51A, M97T, G197D, y E221K.

60 La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la invención puede comprender las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, y F526L. En otras palabras, la al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste de M8R, V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L puede ser M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, y F526L,

Una realización preferida de la invención es una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada del SEQ ID NO: 14.

Una realización preferida adicional es una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada que comprende: (i) el SEQ

5 ID NO: 14; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 14 (es decir, variantes del SEQ ID NO: 14) en donde la secuencia de aminoácidos conserva los aminoácidos que se muestran en tipo de letra de color blanco en un fondo de color negro para M4 (que tiene el SEC ID NO: 14) en la FIG. 2, es decir, en donde la secuencia de aminoácidos conserva los aminoácidos R8, S107, S123, G239, A434, E478, P497, L526 y R553 del SEQ ID NO: 14.

10 Un aspecto preferido de la descripción es una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada del SEQ ID NO: 15. Otro aspecto preferido adicional de la descripción es una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada que comprende: (i) el SEQ ID NO: 15; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 15 (es decir, variantes del SEQ ID NO: 15) en donde la secuencia de aminoácidos conserva los aminoácidos que se muestran en tipo de letra de color blanco en un fondo de color negro para M5 (que tiene la SEC ID NO: 15) en la FIG. 2, es decir, en donde la secuencia de aminoácidos conserva los aminoácidos A51, T97, D197, K221, E478, A515 y L526 del SEQ ID NO: 15.

15 En particular, la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 aislada de los dos párrafos anteriores tienen una o más de las propiedades mejoradas anteriormente mencionadas. Preferiblemente, la propiedad mejorada es una mayor termoestabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de tipo salvaje.

20 La una o más mutaciones adicionales antes mencionadas pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. En particular, la una o más mutaciones adicionales son, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas, mutaciones en las posiciones de aminoácidos que proporcionan mejores propiedades de la ADN polimerasa de phi29 como se conoce en la técnica (y en particular las destacadas en color gris en la FIG. 2, y citado más abajo, que se encontraron en el procedimiento de selección descrito en la presente memoria), y adiciones de aminoácidos en los extremo N y/o C terminales. La una o más mutaciones adicionales mejoran o al menos no alteran las propiedades funcionales mejoradas de la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la presente invención como se define anteriormente. Las características de este párrafo también se aplicarán en relación con las variantes mencionadas en los párrafos anteriores, que comprenden las mutaciones en el SEQ ID NO: 14 y el SEQ ID NO: 15.

30 La presente invención proporciona adicionalmente un método para amplificar un ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo el método

35 poner en contacto el ADN que va a ser amplificado con una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 como se ha descrito anteriormente (que puede ser considerado como ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante, por ejemplo un mutante del SEQ ID NO: 10), y  
incubar de la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 y el ADN a una temperatura mayor de 30°C en condiciones que dan como resultado un ADN amplificado.

40 La presente invención también proporciona un método para amplificar un ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo el método poner en contacto el ADN que va a ser amplificado con una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 que comprende una mutación M8R, e incubar la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante y el ADN en condiciones que dan como resultado un ADN amplificado, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 tiene mayor estabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje, y, opcionalmente, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende adicionalmente al menos una mutación seleccionada entre V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.

45 En particular, en los métodos anteriores la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 puede comprender las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, y E221K.

50 En particular, en los métodos anteriores la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 puede comprender las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K Q497P, K512E, y F526L.

55 En los métodos descritos anteriormente la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante puede generar una mayor cantidad de producto de amplificación de ADN en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

Además o alternativamente la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante puede tener un mayor grado de fidelidad de la ADN polimerasa en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

60 Además o alternativamente la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante puede tener una vida media más larga en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

Además o alternativamente la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 puede tener mayor catálisis en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

El ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la invención descrita en la presente memoria se puede usar en los métodos anteriores.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La FIG. 1 muestra sustituciones de residuos de aminoácidos en clones seleccionados.  
 La FIG. 2 muestra el alineamiento CLUSTALW de 30 secuencias de proteínas seleccionadas (SEQ ID NO 10-40, respectivamente, en orden de aparición).  
 Las FIG. 3A-F comparan la vida media ( $T_{1/2}$ ) de las actividades entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29.  
 10 Las FIG. 4A-B comparan las actividades de  $T_{1/2}$  entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29 que contienen mutaciones individuales.  
 Las FIG. 5A-C comparan la eficacia de la reacción de amplificación del desplazamiento múltiple (MDA) entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29.  
 15 La FIG. 6 compara la uniformidad de cobertura entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29.  
 La FIG. 7 compara el contenido GC entre tras el análisis del genoma completo (WGA) entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29.  
 20 La FIG. 8 compara la unión de ADN entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29.

Se llevó a cabo la mutagénesis aleatoria del gen de la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje y se creó una biblioteca mutante. Las ADN polimerasas de phi29 mutantes se seleccionaron utilizando un esquema de auto-replicación compartimentada (CSR) modificado. Se utilizó reacción de amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) para escrutar una biblioteca de ADN polimerasa de phi29 mutante para encontrar enzimas que eran más termostables y catalíticamente más rápidas. Se llevaron a cabo siete rondas de escrutinio aumentando la temperatura de reacción de 40°C a 50°C y acortando el tiempo de reacción de 16 horas a 4 horas. Los clones seleccionados de ADN polimerasa de phi29 mutada aleatoriamente se secuenciaron y se analizaron. Los datos de secuenciación revelaron posibles mutaciones con un efecto estabilizador sobre la proteína de la polimerasa del ADN de phi29 y posibilitaron actividad enzimática a temperaturas más altas en comparación con la enzima de tipo salvaje.

La FIG. 1 muestra sustituciones de aminoácidos que se encuentran en los clones seleccionados. Se identificaron doce mutaciones encontradas con más frecuencia, éstas fueron M8R; V51A; M97T; L123S; G197D; K209E; E221K; E239G; Q497P; K512E; E515A; F526L.

La FIG. 2 muestra alineamiento de secuencias múltiples, utilizando Clustalw, de 30 secuencias de proteínas de tipo salvaje y mutantes. Como se conoce en la técnica, tal alineamiento identifica regiones de similitud que puede ser una consecuencia de la relación funcional, estructural, o evolutiva. La secuencia ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje, designada como wt, se proporciona como primera secuencia. Las mutaciones están marcadas con tipo de letra de color blanco en un fondo de color negro. Las posiciones de aminoácidos, cuyas mutaciones proporcionan propiedades mejoradas de ADN polimerasa de phi29 como se conoce en la técnica, están marcados como columnas de aminoácidos (tipo de letra de color negro) resaltadas en gris. Las mutaciones procedentes de la selección actualmente descrita y ubicadas en las columnas de color gris indican que el procedimiento de selección de la invención se dirige precisamente a los sitios recurrentemente mutados "hot spot" beneficiosos o incluso al cambio de aminoácido exacto descrito en otro lugar. Las posiciones de aminoácidos y las referencias son: T15, C22, N62, K132, K135, D169, V250, Y254, P255, C290, L351, K371, E375, A377, K379, Q380, K383, L384, N387, S388, C448, D456, D458, K478, E486, K512, K525, C530 referidas en el documento WO 2009091847A2; N62, K135, T368, E375, E486, K512 referidas en el documento EP 1963536A2; K135, T368, T372, K478, L480, K512 referidas en el documento EP 2089517A2; K64, F69, I70, I71, N72, W73, L74, E75, R76, T92, Y101, F128, K143, P153, I179, Q183, M188, T189, G191, F198, F211, R236, D249, N251, L253, Y254, P255, Y259, Q303, K305, N313, F360, F363, D365, T368, I370, K371, T372, T373, S374, E375, G376, A377, I378, K379, Q380, L381, A382, K383, L384, M385, L386, N387, S388, L389, Y390, G391, K392, F393, A394, S395, N396, P397, K402, Y405, L406, K407, E408, N409, G410, A411, L412, G413, F414, K422, I433, D458, K478, L480, A484, E486, R496, Q497, Y500, I504, K507, E508, V509, D510, G511, K512, L513, V514, C529, A531, G532, T534, K538, K555, P558, Q560, V561, P562, G563, G564, D570, F572, I574, K575 referidas en el documento US 20100112645A1; y N62, F128, F230, W232, M246, F248, Y254, P300, Y315, F363, W367, T368, Y369, I378, M385, Y454, H461, Y482, W483, H485, F489, Y494, Y500, Y505, M506, Y521, F526 referidas en el documento US 20100093555A1.  
 60 Los mutantes descritos aumentaron la estabilidad de proteínas. Las ADN polimerasas de phi29 mutantes funcionaron a temperaturas elevadas, definidas como temperaturas superiores a 30°C y tenían mayor estabilidad, definida en mezclas de reacción sin sustrato.

Los mutantes descritos mostraron síntesis de ADN más rápida y más eficiente. Esto dio como resultado un tiempo

más corto de síntesis de ADN, generación de más producto, y aumento de umbral de sensibilidad.

Los mutantes descritos aumentan la estabilidad del complejo de ADN polimerasa de phi29 y ADN, debido a una mayor afinidad por el sustrato de ADN.

5 Los mutantes descritos aumentaron capacidad de procesamiento. Los mutantes mostraron mayor afinidad por el ADN y mayor velocidad de reacción, que podría sintetizar más producto sin disociación del ADN.

10 Los mutantes descritos mostraron amplificación no sesgada del genoma completo. La elevación de la temperatura de las reacciones de WGA podría dar como resultado en un menor sesgo de amplificación, mediante la eliminación de los efectos de las diferencias de contenido de GC.

15 Los mutantes descritos mostraron resistencia a los inhibidores. Debido a su efecto estabilizador sobre la ADN polimerasa de phi29, los mutantes pueden aumentar la resistencia a inhibidores tales como heparina, formamida, hidrocloreuro de guanidina, y/o daños foto-oxidativos.

Los mutantes descritos mostraron una mayor precisión; es probable que se produzca mayor fidelidad de la ADN polimerasa con una mayor estabilidad y capacidad de procesamiento del complejo de ADNP de phi29-ADN.

20 En un aspecto de la descripción, las variantes de la ADN polimerasa de phi29 contenían cualquier mutación única entre M8R; V51A; M97T; L123S; G197D; K209E; E221K; E239G; Q497P; K512E; E515A; F526L, o cualquier combinación de mutaciones entre M8R; V51A; M97T; L123S; G197D; K209E; E221 K; E239G; Q497P; K512E; E515A; F526L. En un aspecto, Mut\_4 comprende cinco de estas 12 mutaciones: M8R, V51A, M97T, G197D, E221K. En un aspecto, Mut\_5 comprende ocho de estos 12 mutaciones: M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, F526L. La descripción incluye el uso de estas mutaciones, individualmente o combinadas.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran el uso de los mutantes y métodos.

Ejemplo 1

30 Selección de mutantes de ADN polimerasa de phi29 termoestables y más rápidos

Un esquema de selección de la ADN polimerasa de phi29 termoestable y más rápido se basó en la estrategia de autoreplicación compartimentada (CSR) (Ghadessy et al. 2001) con modificaciones.

35 El gen de la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje se mutó utilizando PCR propensa error. La biblioteca de genes mutados se transformó en células de *Escherichia coli* ER2566 y se expresó la ADN polimerasa de phi29. Las células de *E. coli* inducidas que expresaban en exceso las polimerasas mutantes se lavaron dos veces con 1 x tampón Tango y se añadieron 0,5 mg/ml de lisozima. La suspensión se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Las células transformadas y otros componentes de la reacción se emulsionaron utilizando el siguiente protocolo:

45 Se añadieron aproximadamente 0,3 ml de la mezcla de CSR que contenía 1 x tampón Tango (Tris-acetato 330 mM (pH 7,9 a 25°C), Mg-acetato 100 mM, K-acetato 660 mM, 1 mg/ml de BSA), mezcla de cebadores al azar resistente a Exo 25 mM (5'-NpNpNpNpNp<sup>s</sup>NP<sup>s</sup>N-3'), 0,3 M de cebadores núm. 1 (5'-CTG CAG CAT TAA TGA ATC GGC CAAP<sup>s</sup>Cp<sup>s</sup>G-3') (SEQ ID NO: 1) y núm. 2 (5'-TTA GCA GCC GGA TCT CAGp<sup>s</sup>TP<sup>s</sup>G-3') (SEQ ID NO: 2), dNTP 1 mM y 1 x 10<sup>7</sup> de células de *E. coli* inducidas que expresaban en exceso polimerasas mutantes a 0,7 ml de la fase oleosa que contenía ABIL EM 90 al 2% (vol/vol), Triton X-100 0,055 (vol/vol) en aceite mineral con agitación constante (1714 rpm) a + 4°C (p<sup>s</sup> = fosforotioato). Después de la adición de la fase acuosa (gradualmente durante dos min), la agitación continuó durante cinco min. A continuación, la emulsión se congeló a -80°C y se descongeló a 37°C - 50°C (la temperatura se aumentó gradualmente después de cada ronda de selección). Se realizaron cinco ciclos de congelación-descongelación. La emulsión se incubó después durante 16-2 horas (el tiempo de incubación se redujo gradualmente después de cada ronda de selección).

55 Después de la incubación la fase acuosa se extrajo utilizando el siguiente protocolo:

1. Transferir 400 µl de emulsión al tubo de 1,5 ml e incubar a 75°C durante 10 minutos y centrifugar durante tres minutos a 13 000 rpm a temperatura ambiente, desechar la fase superior (oleosa).
2. Añadir 700 µl de éter dietílico saturado con agua, someter a vórtice el tubo, centrifugar durante un minuto a 13000 rpm y desechar la fase superior (disolvente).
3. Añadir 750 µl de acetato de etilo saturado con agua, someter a vórtice el tubo, centrifugar durante un minuto a 13000 rpm y desechar la fase superior (disolvente).
4. Repetir el paso 2.
5. Eliminar el disolvente residual de la emulsión rota centrifugando a vacío durante diez minutos a 37°C.

El ADN se extrajo de la fase acuosa utilizando el siguiente protocolo:

1. Añadir un volumen igual de solución de fenol/cloroformo (1:1) a la fase acuosa, someter a vórtice y centrifugar durante cinco minutos a 13000 rpm.
2. Retirar la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir un volumen igual de cloroformo, someter a vórtice y centrifugar durante cinco minutos a 13000 rpm.
3. Retirar la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, a la fase acuosa y después 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Incubar a -20°C durante la noche o durante 30 - 60 min, centrifugar durante diez minutos a 13000 rpm.
4. Eliminar el sobrenadante y añadir 180 µl de etanol del 70% (v/v), centrifugar durante dos minutos a 13000 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado a temperatura ambiente. Disolver el precipitado en 37 µl de 1 x tampón de Fast Digest (Thermo Fisher Scientific).

Después de la extracción con cloroformo/fenol y la precipitación con etanol el ADN genómico de *E. coli* se digirió y el producto de MDA se linealizó mediante la adición de 1,5 µl de endonucleasas de restricción FD Dpnl y FD AlwNI. La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 37°C y cinco minutos a 65°C.

Los productos de selección se amplificaron con cebadores núm. 3 (5'-GCG AGC CCG ATC TTC CCC ATC G-3') (SEQ ID NO: 3) y núm. 4 (5'-TTA GCA GCC GGA TCT CAG TG-3') (SEQ ID NO: 4). Después de la amplificación de los productos de PCR que contenían los genes de ADN polimerasa de phi29 mutados se volvieron a clonar y se transformaron en células de *Escherichia coli* ER2566 para las rondas sucesivas de selección.

#### Ejemplo 2

Medición de la media vida ( $T_{1/2}$ ) de mutantes de ADN polimerasa de phi29

El aumento de la termoestabilidad de la proteína se evaluó mediante la medición de la vida media ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de la enzima a una temperatura concreta. Una vida media más larga indica una enzima más estable.

Se construyeron dos variantes mutantes de ADN polimerasa de phi29. La variante Mut\_4 de la ADN polimerasa de phi contiene 5 mutaciones (M8R, V51A, M97T, G197D, E221K), éstas nunca se habían caracterizado antes. La variante Mut\_5 de la ADN polimerasa de phi29 contiene 8 reemplazos de aminoácidos seleccionados más frecuentemente (FIG. 1 y 2) (M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, F526L). Cinco mutaciones son las mismas que en la enzima Mut\_4 (mutaciones subrayadas). Tres mutaciones introducidas adicionalmente son conocidas (Publicaciones U.S. Núm. 2010009355A1, 20100112645A1 y documento EP2089517A2); los también son importantes para la mejora de propiedades de la ADN polimerasa de phi29. Las variantes de ADN polimerasa de tipo salvaje y mutantes de phi29 se purificaron hasta más del 95% de homogeneidad de proteínas utilizando cinco etapas de cromatografía de intercambio iónico. La termoestabilidad de las enzimas de tipo salvaje, Mut\_4 y Mut\_5 con y sin sustrato se midió a 30°C, 37°C y 40°C.

En este ejemplo, la vida media ( $T_{1/2}$ ) de diferentes ADN polimerasas de phi29 sin sustrato se determinó utilizando el siguiente protocolo.

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10x tampón para phi29	4 µl	40 µl
H <sub>2</sub> O	35 µl	350 µl
ADN polimerasa de phi29 (100 ng/l)	1 µl	10 µl
Total	40 µl	400 µl
(10x tampón para phi29: Tris-acetato 330 mM, pH 7,9, Mg-acetato 100 mM, K-etilo 660 mM, Tween 20 al 1% (v/v), DTT 10 mM)		

2. Incubar las muestras a la temperatura apropiada durante 0 h-16 h (las muestras de control que se incuban durante 0 horas se refieren a 100% de actividad).
3. Después de la incubación, transferir muestras a un baño de hielo y añadir 10 µl de solución A.



## ES 2 578 103 T3

Solución A	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10 x tampón para phi29	1 µl	10 µl
Cebador al azar resistente a Exo (500 µM)	2,5 µl	25 µl
mezcla de dNTP (10 mM)	5 µl	50 µl
dCTP- <sup>3</sup> H (37 µM)	0,25 µl	2,5 µl
ADN plasmídico de hebra sencilla del bacteriófago M13 (0,805 mg/ml)	1,25 µl	12,5 µl
Total	10 µl	100 µl

4. Incubar las muestras a 30°C durante 10 min
5. Detener la reacción mediante la adición de 5 µl de EDTA (0,5 M)
- 5 6. Transferir 40 µl de mezcla de reacción en el papel de filtro DE-81 (1,5 x 1,5 cm).
7. Secar los papeles
8. Lavar tres veces los papeles con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 7,5% x 10 H<sub>2</sub>O
9. Lavar una vez con agua destilada
10. Secar los papeles
- 10 11. Transferir los papeles a viales de centelleo y medir las cpm. La actividad residual se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad residual (\%)} = [\text{cpm (muestra)} - \text{cpm (blanco)}] * 100\% / [\text{cpm (muestra de control)} - \text{cpm (blanco)}].$$

- 15 La vida media (T<sub>1/2</sub>) de diferentes ADN polimerasas de phi29 con sustrato se determinó utilizando el siguiente protocolo:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10 x tampón para phi29	4,45 µl	44,5 µl
ADN plasmídico de hebra sencilla del bacteriófago M13 (0,805 mg/ml)	1,25 µl	12,5 µl
Cebador al azar resistente a Exo (500 M)	2,5 µl	25 µl
H <sub>2</sub> O	35 µl	350 µl
ADN polimerasa de phi29 (100 ng/l)	1 µl	10 µl
Total:	44,2 µl	442 µl

(10x tampón para phi29: Tris-acetato 330 mM, pH 7,9, Mg-acetato 100 mM, K-etilo 660 mM, Tween 20 al 1% (v/v), DTT 10 mM)

- 20 2. Incubar las muestras a la temperatura apropiada durante 0 h -16 h (las muestras de control que se incuban durante 0 horas refieren actividad de 100%).
3. Después de la incubación transferir las muestras a un baño de hielo y añadir 5,8 µl de solución B.

Solución B	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10 x tampón para phi29	0,55 µl	5,5 µl
mezcla de dNTP (10 mM)	5 µl	50 µl
dCTP- <sup>3</sup> H (37 mM)	0,25 µl	2,5 µl
Total	5,8 µl	58 µl

- 25 4. Incubar las muestras a 30°C durante diez min.
5. Detener la reacción mediante la adición de 5 µl de EDTA (0,5 M).
6. Transferir 40 µl de mezcla de reacción en el papel de filtro DE-81 (1,5 x 1,5 cm).
7. Secar los papeles
8. Lavar tres veces los papeles con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 7,5% x 10 H<sub>2</sub>O.
- 30 9. Lavar una vez con agua destilada
10. Secar los papeles

11. Transferir los papeles a viales de centelleo y medir las cpm. La actividad residual se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad residual (\%)} = [\text{cpm (muestra)} - \text{cpm (blanco)}] * 100\% / [\text{cpm (muestra de control)} - \text{cpm (blanco)}].$$

Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de las enzimas ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje y mutantes Mut\_4 y Mut\_5 se midieron en presencia (FIG. 3D-F) y ausencia de sustrato (FIG. 3A-C), a 30°C (FIG. 3A, D), 37°C (FIG. 3B, E) o 40°C (FIG. 3C, F). Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de las ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje sin sustrato a 30°C y 37°C fueron 18 min y <3 minutos, respectivamente (Fig. 3, Tabla 1).

Tabla 1. Vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de las ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje y mutantes sin sustrato

	$T_{1/2}$ a 30°C	$T_{1/2}$ a 37°C	$T_{1/2}$ a 40°C
Peso	18 min	<3 min	-
Mut_4	16 hr	20 min	8 min
Mut_5	> 16 hr	16 hr	15 min

mutante Mut\_4 con las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K; mutante Mut\_5 con las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, F526L

Las enzimas mutantes Mut\_4 y Mut\_5 fueron sustancialmente más termoestables y perdieron la mitad de su actividad después de 16 horas a 30°C, y después de 20 minutos a 37°C. Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de Mut\_4 y Mut\_5 también se midieron a 40°C y fueron 8 min y 15 min, respectivamente. La enzima de tipo salvaje a 40°C pierde su actividad inmediatamente.

Todas las variantes de la enzima de phi29 se estabilizaron en el complejo con el sustrato. Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje con sustrato a 30°C y 37°C fueron de 100 min y 15 minutos, respectivamente (Fig. 3, Tabla 2).

Tabla 2. Vida media ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de las ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje y mutantes con sustrato

	$T_{1/2}$ a 30°C	$T_{1/2}$ a 37°C	$T_{1/2}$ a 40°C
en peso	100 min	15 min	-
Mut_4	> 16 hr	16 horas	1 hr
Mut_5	> 16 hr	> 16 hr	16 hr

mutante Mut\_4 con las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K; mutante Mut\_5 con las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, F526L

Las enzimas mutantes Mut\_4 y Mut\_5 fueron aún más termoestables teniendo vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad con sustrato de 16 h y más a 30 - 37°C, y 1 h o 16 h a 40°C. La enzima de tipo salvaje, incluso en un complejo con el sustrato, pierde su actividad a 40°C inmediatamente.

La variante mutante de ADN polimerasa de phi29 Mut\_4 fue sustancialmente más estable en comparación con la enzima de tipo salvaje (Fig. 3, Tablas 1 y 2). Fue así como se llegó a la conclusión de que cambios en los aminoácidos M8R, V51A, M97T, G197D, y E221K están directamente implicados y son responsables de la mayor termoestabilidad de la enzima con y sin sustrato.

La variante de la ADN polimerasa de phi 29 Mut\_5 fue aún más termoestable en comparación con la ADN polimerasa de phi 29 Mut\_4 (Fig. 3, Tablas 1 y 2). Por lo tanto, se concluyó que las mutaciones Q497P, K512E, y F526L adicionales también son importantes en la termoestabilización proteína con y sin sustrato.

#### Medición de la media vida ( $T_{1/2}$ ) de mutantes de ADN polimerasa de phi29 que contienen mutaciones individuales

Se construyeron nueve variantes mutantes que contenían la sustitución de un solo aminoácido (M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, E515A, F526L). Seis residuos de histidina (6xHis) (SEQ ID NO: 5) que contenían las etiquetas se fusionaron al extremo C terminal de ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje y mutantes. Las polimerasas etiquetadas con His se purificaron a más de 95% de homogeneidad de proteínas utilizando la cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados. La termoestabilidad de las de tipo salvaje y las mutantes sin y con sustrato, se midió a 30°C y 40°C.

## ES 2 578 103 T3

En este ejemplo, la vida media ( $T_{1/2}$ ) de diferentes ADN polimerasas de phi29 sin sustrato se determinó utilizando el siguiente protocolo.

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10x tampón Tango	4 $\mu$ l	40 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	35 $\mu$ l	350 $\mu$ l
ADN polimerasa de phi29 (100 ng/l)	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Total	40 $\mu$ l	400 $\mu$ l

(10x tampón Tango: Tris-acetato 330 mM, pH 7,9, Mg-acetato 100 mM, K-etilo 660 mM 1 mg/ml de BSA).

- 5
2. Incubar las muestras a 30°C durante 0 a 150 min (las muestras de control que se incuban durante 0 horas se refieren a 100% de actividad).
  3. Después de la incubación, transferir muestras a un baño de hielo y añadir 10  $\mu$ l de solución A.

Solución A	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10 x tampón Tango	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Cebador al azar resistente a Exo (500 M)	2,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
mezcla de dNTP (10 mM)	5 $\mu$ l	50 $\mu$ l
dCTP- <sup>3</sup> H (37 mM)	0,25 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
ADN plasmídico de hebra sencilla del bacteriófago M13 (0,805 mg/ml)	1,25 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l

- 10
4. Incubar las muestras a 30°C durante 10 min
  5. Detener la reacción mediante la adición de 5  $\mu$ l de EDTA (0,5 M)
  6. Transferir 40  $\mu$ l de mezcla de reacción en el papel de filtro DE-81 (1,5 x 1,5 cm).
  7. Secar los papeles
- 15
8. Lavar tres veces los papeles con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 7,5% x 10 H<sub>2</sub>O.
  9. Lavar una vez con agua destilada
  10. Secar los papeles
  11. Transferir los papeles a viales de centelleo y medir las cpm. La actividad residual se calcula utilizando la siguiente fórmula:

20

$$\text{Actividad residual (\%)} = [\text{cpm (muestra)} - \text{cpm (blanco)}] * 100\% / [\text{cpm (muestra de control)} - \text{cpm (blanco)}].$$

La vida media ( $T_{1/2}$ ) de diferentes ADN polimerasas de phi29 con sustrato se determinó utilizando el siguiente protocolo:

25

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10 x tampón Tango	4,45 $\mu$ l	44,5 $\mu$ l
ADN plasmídico de hebra sencilla del bacteriófago M13 (0,805 mg/ml)	1,25 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
Cebador al azar resistente a Exo (500 M)	2,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	35 $\mu$ l	350 $\mu$ l
ADN polimerasa de phi29 (100 ng/l)	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Total	44,2 $\mu$ l	442 $\mu$ l

(10x tampón Tango: Tris-acetato 330 mM, pH 7,9, Mg-acetato 100 mM, 1 mg K-etilo 660 mM/ml BSA).

- 30
2. Incubar las muestras a 40°C durante 0 a 900 min (las muestras de control que se incuban durante 0 horas se refieren a la actividad de 100%).
  3. Después de la incubación transferir las muestras a un baño de hielo y añadir 5,8  $\mu$ l de solución B.

Solución B	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10 x tampón Tango	0,55 µl	5,5 µl
mezcla de dNTP (10 mM)	5 µl	50 µl
dCTP- <sup>3</sup> H (37 mM)	0,25 µl	2,5 µl
Total	5,8 µl	58 µl

4. Incubar las muestras a 30°C durante 10 min.
5. Detener la reacción mediante la adición de 5 µl de EDTA (0,5 M).
- 5 6. Transferir 40 µl mezcla de reacción en el papel de filtro DE-81 (1,5 x 1,5 cm).
7. Secar los papeles
8. Lavar tres veces los papeles con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 7,5% x 10 H<sub>2</sub>O.
9. Lavar una vez con agua destilada
10. Secar los papeles
- 10 11. Transferir los papeles a viales de centelleo y medir las cpm. La actividad residual se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad residual (\%)} = [\text{cpm (muestra)} - \text{cpm (blanco)}] * 100\% / [\text{cpm (muestra de control)} - \text{cpm (blanco)}].$$

- 15 Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de enzimas ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje y mutantes (que contenían mutaciones individuales) se midieron en presencia (Fig. 4B) y ausencia (Fig. 4A) de sustrato. Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de las ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje sin sustrato a 30°C fueron 18 min (Fig. 4A, Tabla 3). Ocho enzimas mutantes que contenían mutaciones individuales (M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, E515A, F526L) eran más termoestables y pierden la mitad de su actividad a 30°C después de 26, 26, 38, 40, 65, 58, 52, 48 min, respectivamente (Fig. 4A, Tabla 3).
- 20

Tabla 3. Vida media ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de las ADN polimerasas de phi29 de tipo salvaje y mutantes con y sin sustrato

	$T_{1/2}$ (min) sin sustrato, medida a 30°C (+/- 1 DT)	$T_{1/2}$ (min) con sustrato, medida a 40°C (+/- 1 DT)
Tipo salvaje	18 (2,8)	37 (2,9)
M8R	26 (2,2)	195 (3)
V51A	26 (4,1)	90 (5,5)
M97T	38 (4,3)	22 (5,7)
G197D	40 (2,7)	400 (2,8)
E221K	65 (5,1)	58 (1,9)
Q497P	58 (3,9)	145 (3,3)
K512E	18 (2,5)	37 (1,2)
E515A	52 (2,8)	220 (2,7)
F526L	48 (2,1)	120 (5,1)

- 25 Todas las variantes de la enzima de phi29 se estabilizan en el complejo con el sustrato, por lo tanto, las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad se podrían medir a 40°C. Las vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad de la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje con el sustrato a 40°C fueron 37 min (Fig. 4B, Tabla 3). Siete enzimas mutantes que contenían mutaciones individuales M8R, V51A, G197D, E221K, Q497P, E515A, F526L eran más termoestables teniendo vidas medias ( $T_{1/2}$ ) de la actividad con sustrato de 195, 90, 400, 58, 145, 220, 120 min respectivamente
- 30 (Fig. 4B, Tabla 3).

### Ejemplo 3

Medición de la eficacia de la reacción de MDA a temperaturas elevadas

- 35 La eficacia de la reacción de amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) se midió a diferentes temperaturas. La generación de más producto de MDA indica amplificación más eficiente.

En este ejemplo la eficacia de la reacción de MDA de diferentes ADN polimerasas de phi29 se evaluó utilizando el siguiente protocolo:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción de MDA:

	Para 1 análisis	Para 10 análisis
10x tampón para phi29	10 µl	100 µl
Mezcla de dNTP 10 mM	10 µl	100 µl
Cebador al azar resistente a Exo (500 M)	5 µl	50 µl
ADN del plásmido pUC19 (10 ng/l)	1 µl	10 µl
ADN polimerasa de phi29 (100 ng/l)	1 µl	10 µl
H <sub>2</sub> O	a 100 µl	Para 1000 µl
Total	100 µl	1000
(10x tampón para phi29: Tris-acetato 330 mM, pH 7,9, Mg-acetato 100 mM, K-etilo 660 mM, Tween 20 al 1% (v/v), DTT 10 mM)		

5 2. Incubar las muestras a temperaturas de 30°C, 37°C, 42°C, 45°C durante 0,5, 1 y 2 horas y a continuación detener la reacción incubando durante 15 min a 75°C. Posteriormente los productos de MDA se linealizan añadiendo 2 µl de endonucleasa de restricción FD AlwNI (Thermo Fisher Scientific) e incubando durante 3 horas a 37°C y durante 10 minutos a 70°C.

10 3. Para evaluar las multiplicidades de amplificación del plásmido pUC19, los productos de MDA fueron analizados mediante qPCR.

La mezcla de reacción de qPCR se preparó como sigue:

	Para 1 análisis	Para 10 análisis
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	125 µl
cebador directo 5'-GTTGGGAAGGGCGATCG-3' (SEQ ID NO: 6)	0,75 µl	7,5 µl
Cebador inverso 5'-ACTTTATGCTTCCGGCTCGTA-3' (SEQ ID NO: 7)	0,75 µl	7,5 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl	60 µl
Producto de MDA diluido con tampón TE	5 µl	-
Total	25 µl	200 µl
Las multiplicidades de amplificación del plásmido pUC19 se calcularon utilizando la siguiente fórmula: Multiplicidad de amplificación = número de copias de pUC19 después de MDA/número de copias de pUC19 antes de MDA		

15 La reacción de MDA a diferentes temperaturas se realizó utilizando ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje (Fig. 5A) y las enzimas mutantes Mut\_4 (Fig. 5B) y Mut\_5 (Fig. 5C). Las multiplicidades de amplificación del plásmido pUC19 utilizado como sustrato en la reacción de MDA fueron evaluadas mediante qPCR después de 0,5, 1 y 2 horas de reacción de MDA realizada a diferentes temperaturas. Los resultados indicaron que la reacción de MDA impulsada por ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje era más eficiente a 30°C en comparación con 37°C (Fig. 5A, Tabla 4). Las enzimas mutantes Mut\_4 y Mut\_5 fueron capaces de realizar la reacción de MDA a 37°C, 42°C y 45°C (Fig. 5B, C, Tabla 4). La acumulación de producto de MDA fue aproximadamente dos veces más alta utilizando Mut\_4 a 37°C y Mut\_5 a 42°C en comparación con la enzima de tipo salvaje a 30°C (temperatura óptima) (Fig. 5, Tabla 4). Este ejemplo mostró que las ADN polimerasas de phi29 mutantes que tiene la estructura de proteínas más estables eran más estables en la mezcla de reacción, pudieron trabajar a mayores temperaturas (37°C - 45°C), y pudieron generar más producto de amplificación en comparación con la enzima de tipo salvaje.

20

25

Tabla 4. La comparación de la eficiencia de MDA entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de ADN polimerasa de phi29. Las multiplicidades de amplificación del plásmido pUC19 se determinaron mediante QPCR.

Prototipo de polimerasa (temperatura de reacción)	Duración de la reacción de MDA (hr)		
	0,5	1	2
WT (30°C)	49 (12)	509 (277)	988 (290)
WT (37°C)	25 (19)	131 (10)	241 (113)
Mut_4 (37°C)	77 (30)	425 (98)	1754 (343)
Mut_4 (42°C)	117 (74)	288 (108)	786 (386)
Mut_5(42°C)	248 (91)	1099 (317)	2585 (249)
Mut_5(45°C)	257 (79)	772 (213)	1537 (416)

#### Ejemplo 4

5

#### Amplificación no sesgada del genoma completo

El sesgo de la amplificación del genoma completo (WGA) se evaluó mediante la secuenciación de los productos de WGA obtenidos utilizando ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje y enzimas mutantes Mut\_4 y Mut\_5. Se llevó a cabo el siguiente esquema:

10

1. Se amplificaron aproximadamente el 20 ng de ADNg de *E. coli* de la cepa JM109 utilizando enzimas de tipo salvaje y mutantes Mut\_4 y Mut\_5. Las reacciones WGA se realizaron a 30°C, 37°C y 42°C durante 8 horas, 4 horas y 3 horas utilizando enzimas de tipo salvaje, y mutantes Mut\_4 Mut\_5 respectivamente. Típicamente, como resultado de la reacción de WGA se sintetizaron 35 g - 55 g de ADN.

15

2. El ADN sintetizado en la reacción WGA se sometió a sonicación para obtener fragmentos de una longitud óptima (300 pb - 400 pb). Los extremos de los fragmentos de ADN compartidos se repararon y se ligaron adaptadores de secuenciación Illumina utilizando el protocolo A de ClaSeek Biblioteca Preparation Kit (Thermo Scientific). Antes de la amplificación de puente y después de la reacción de secuenciación los fragmentos de ADN se purificaron utilizando cuentas magnéticas Agencourt y un protocolo de selección por tamaño.

20

3. Las bibliotecas de NGS generadas se cuantificaron utilizando el kit Kapa Biosystems Library Quantification y se secuenciaron utilizando la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq. Se utilizaron el kit de secuenciación v2 2x150 pb (extremo emparejado) y el protocolo de resecuenciación. Las secuencias fueron alineadas frente a la cepa de ADN genómico de *E. coli* K12. Se generaron un total de 13,8 millones de lecturas con 94,5 por ciento de las bases convocadas con Q30 y por encima.

25

Como "patrón oro" para la amplificación no sesgada, se secuenció el genoma de *E. coli* de referencia que no se había amplificado (biblioteca de NGS libre de PCR). Se compararon los datos de cobertura del genoma secuenciado del genoma de *E. coli* no amplificado ("patrón oro") y los genomas amplificados de WGA. El gráfico de uniformidad de cobertura mostrado en la FIG. 6 demostró que el promedio de cobertura (normalizado a 1, eje de las X) es característico para una porción concreta del genoma (eje de las Y), donde la uniformidad de cobertura (E) muestra que la porción de las bases afectadas es similar al promedio de cobertura (1,0). En este ejemplo, ~80% de las regiones elegidas como diana del ADNg libre de PCR estaban cubiertas con >0,8 de cobertura media y ~20% de las lecturas tenían >1,2 de cobertura media. El número de uniformidad de cobertura se calculó como describen Mokry et al. 2010. Cuanto más próximo esté el valor a 1 mejor uniformidad de cobertura. El valor de uniformidad cobertura de secuenciación para la biblioteca de ADN amplificada por WGA generado utilizando ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje fue de 0,39; los valores de E para las bibliotecas de Mut\_4 y Mut\_5 amplificadas fueron 0,70 y 0,76, respectivamente (E de ADNg de *E. coli* = 0,91 (ADNg de *E. coli* no amplificado), E de WT = 0,39 (0,04) (producto WGA que se amplificó en condiciones convencionales utilizando ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje), E de Mut\_5 = 0,76 (0,01) (producto de WGA que se amplificó a 42°C utilizando la polimerasa mutante), E de Mut\_4 = 0,70 (0,02) (producto de WGA que se amplificó a 37°C utilizando la polimerasa mutante).

30

35

40

45

50

El porcentaje de CG en fragmentos de 100 pb de secuencias de las lecturas se calculó para las cuatro rondas de secuenciación (Fig. 7). La FIG. 7 representa el porcentaje de fragmentos de 100 pb de longitud y el contenido de GC en las lecturas. La biblioteca de WGA que se preparó utilizando la enzima de tipo salvaje contiene más fragmentos con menor contenido de GC y menos porcentaje de fragmentos con mayor contenido de GC. La biblioteca de NGS amplificada con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje tuvo un ligero desplazamiento del pico de porcentaje de CG a un menor contenido de GC. El desplazamiento del pico de porcentaje de CG de la biblioteca de NGS amplificada por la enzima Mut\_4 fue menor en comparación con la polimerasa de phi29 wt. El porcentaje del pico de CG de la biblioteca de NGS amplificada por la enzima Mut\_5 fue casi idéntico a los datos de ADNg de *E. coli* (Fig. 7).

Es muy probable que la enzima de tipo salvaje que lleva a cabo la reacción de WGA a 30°C tienda a amplificar las regiones del genoma con un menor contenido de CG. El sesgo de la amplificación de CG podría ser reducido significativamente realizando WGA con las polimerasas Mut\_4 y Mut\_5 a 37°C y 42°C respectivamente. La reducción del sesgo de amplificación también debe dar lugar a disminución del efecto de la pérdida de alelo (ADO).

5

## Ejemplo 5

## Análisis de unión a ADN de mutantes de polimerasa de phi29

El análisis de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA) se realizó utilizando como sustrato la molécula de ADN de 15 unidades/21 unidades híbrida marcada para determinar si nuevas mutaciones de la ADN polimerasa de phi29 potenciaron la unión de la enzima al ADN. El oligonucleótido de 15 unidades (5'-GATCACAGTGAGTAC-3') (SEQ ID NO: 8) se marcó en 5' con ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]utilizando polinucleótido quinasa de T4 y se hibridó con el oligonucleótido de 21 unidades (5'-TCTATTGTACTACTGTGATC-3') (SEQ ID NO: 9) en presencia de NaCl 0,2 M y Tris-HCl 60 mM, pH 7,5 (De Vega, M. et al., 2010). La molécula híbrida de 15 unidades/21 unidades marcado en 5' resultante se utilizó como cebador/molde de ADN para analizar la interacción con las enzimas de phi29 de tipo salvaje o mutantes que contenían mutaciones únicas o múltiples. La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 20  $\mu$ l, Tris-acetato 33 mM de pH 7,9, acetato de potasio 66 mM, glicerol al 10%, 0,1 mg/ml de BSA, 2 pM del sustrato de ADN de 15 unidades/21 unidades/ADN, y cantidades crecientes de la enzima correspondiente (0,10, 20, 40, 80, 160, 300, 600 pM). Después de incubación durante cinco minutos a 30°C, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) (29:1, acrilamida: bisacrilamida) que contenían Tris-acetato 40 mM de pH 8,4, EDTA 1 mM (tampón 1XTAE). La electroforesis se realizó en el mismo tampón 1XTAE a temperatura ambiente durante dos horas a aproximadamente 8-9 V/cm. Los geles de EMSA fueron analizados mediante Soporte Lógico de Análisis de Imágenes Typhoon Trio y OptiQuant™. Los valores de Kd del complejo enzima-oligonucleótido se calcularon mediante soporte lógico GraphPad Prism versión 4.03 utilizando la ecuación:  $[E-ADN] = ([DNA_o] + [E_o] + K_d - (([DNA_o] + [E_o] + K_d)^2 - 4 [DNA_o] [E_o]^{0.5})/2)$ ; donde [DNA-E] - es la concentración del complejo enzima-oligonucleótido, [DNA<sub>o</sub>] - Concentración total de oligonucleótidos (2 pM), [E<sub>o</sub>] - concentración total de enzima.

10

15

20

25

30

35

La FIG. La figura 8 muestra un EMSA representativo de la unión de enzima wt, Mu\_4 y Mut\_5 a ADN. La molécula híbrida marcada en 5' de 15 unidades/21 unidades (ADNdh) se incubó con ADN polimerasa de phi29 o con la ADN polimerasa mutante. Después de la electroforesis en gel, la movilidad de ADNdh libre y del complejo de la polimerasa-ADN se detectó mediante autorradiografía. La FIG. 8 es representativa de diversos experimentos (experimentos con mutantes que contienen mutaciones individuales no mostrados). Todos los valores numéricos de la constante de disociación determinada mediante análisis EMSA se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Constantes de disociación (Kd) de los mutantes de la ADN polimerasa de phi29

	Kd (DT)		Kd (DT)
WT	76 (5,7)	Q497P	73 (50,2)
M8R	43 (2,1)	K512E	54 (27,6)
V51A	52 (10,8)	E515A	97 (56,5)
M97T	37 (2,5)	F526L	53 (24,2)
G197D	51 (25,7)	Mut_4	67 (10,6)
E221K	67(18,4)	Mut_5	23 (7,4)

Las enzimas mutantes mostraron una mejor unión al ADN (menor Kd), requiriendo una concentración de enzima aproximadamente dos veces o tres veces menor en comparación con la polimerasa de tipo salvaje para generar una cantidad similar de complejo de proteína y ADN. Los valores de la constante de disociación (Kd) de algunos mutantes que contenían mutaciones individuales (M8R, V51A, M97T), así como de la polimerasa Mut\_5 fueron más bajos que los de la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje (Tabla 5). De Vega et al. 2010 mostraron que la ADN polimerasa de phi29 con dominio de unión a ADN adicional tenían mayor afinidad por el sustrato, y posteriormente también se mejoraron otras características de enzimas como la capacidad de procesamiento y el rendimiento de amplificación. Puesto que los mutantes de ADN polimerasa de phi29 descritos también poseen una mayor afinidad por el sustrato, sería razonable esperar que tales mutantes muestren mejoras en otras características importantes de esta enzima.

40

45

## Referencias:

50

1. Akesson et al. (2010) Processive Replication of single DNA molecules in a nanopore catalyzed by phi29 DNA polymerase. J. Am. Chem. Soc. Vol. 132 Núm. 50 págs. 17961-17972
2. Alsmadi et al. (2009) Specific and complete human genome amplification with improved yield achieved by

- phi29 DNA polymerase and a novel primer at elevated temperature. BMC Reaserch Notes. 2:48.
3. Blanco et al. (1989) Highly efficient DNA synthesis by phage phi29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. J Biol Chem. Vol. 264, Núm. 15, págs. 8935-8940
- 5 4. Bernad et al. (1987) Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. EMBO J. Vol. 6, Núm. 13, págs. 4219-4225.
5. Berman et al. (2007) Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerase. EMBO J. Vol. 26, Núm. 14, págs. 3494-3505, ISSN 0261-4189 (Print).
6. Dufour et al. (2000) An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerase, is required for the functional interaction with primer terminal protein. J Mol Biol. Vol 304, Núm. 3, págs. 289-300
- 10 7. Esteban et al. (1993) Fidelity of phi29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. J Biol Chem. Vol. 268, Núm. 4, págs. 2719-2726.
8. Esteban et al. (1994) 3'-5' exonuclease active site of phi29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. J Biol Chem. Vol. 269, Núm. 50, págs. 31946-31954
- 15 9. Ghadessy et al. (2001) Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98, 4552-4557.
10. Hutchison et al. (2005) Cell-free cloning using phi29 DNA polymerase. PNAS. Vol. 102, Núm. 48, págs. 17332-17336.
- 20 11. Johnes et al. (2009) Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. Trends in Microbiology. Vol 17, No 5, págs. 205 - 211.
12. Kamtekar et al. (2004) Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage phi29. Mol Cell. Vol. 16, Núm. 4, págs. 609-618
13. Lagunavicius et al. (2010) Direct detection of RNA in vitro and in situ by target-primed RCA: The impact of E. coli RNase III on the detection efficiency of RNA sequences distanced far from the 3'-end. RNA. Vol. 25 16) Núm. 8 págs. 1508-1515
14. Lasken et al. (2003) Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. Genome Research. Vol. 13 págs. 954-964
15. Lizardi et al. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Nat Genet, 19, 225-232
- 30 16. De Vega et al. (2010) Improvement of phi29 DNA polymerase amplification by fusion of DNA binding motifs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 107, Núm. 38, págs. 16506-16511.
17. Mokry et al. (2010) Accurate SNP and mutation detection by targeted custom microarray-based genomic enrichment of short-fragment sequencing libraries. Nucleic Acids Res. Vol. 38, Núm. 10, págs. e116.
- 35 18. Rodriguez et al. (2005) A specific subdomain in phi29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 102, Núm. 18, págs. 6407-6412
19. Salas and de Vega (2006) Bacteriophage protein-primed DNA replication. In Recent advances in DNA virus replication. Heffernon, K.L., págs. 259-288, Reasearch Signpost, ISBN 81-3080042-X, Kerala (India)
20. Simmel et al. (2005) Periodic DNA Nanotemplates Synthesized by Rolling Circle Amplification. Nano Letters. 4, -págs. 719-722
- 40 21. Weissman et al. (2008) A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification. PNAS. Vol. 105 Núm. 40 págs. 15499-15504

#### LISTA DE SECUENCIAS

- 45 <110> Skirgaila, Remigijus Povilaitis, Tadas
- <120> Mutantes de ADN polimerasa de phi29 que tienen mayor termoestabilidad y capacidad de procesamiento
- 50 <130> 335939EP/CJS
- <140>
- <141>
- 55 <150> 61/815,893
- <151> 25-04-2013
- <160> 40
- 60 <170> PatentIn Versión 3.5
- <210> 1
- <211> 26
- <212> ADN



<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 5  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <222> (24) .. (26)  
 <223> fosforotioato entre las posiciones  
 10  
 <400> 1  
 cagctgcatt aatgaatcgg ccaacg 26  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 20  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <222> (18)..(20)  
 <223> fosforotioato entre las posiciones  
 25  
 <400> 2  
 ttagcagccg gatctcagtg 20  
 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 35  
 <400> 3  
 gcgagcccga tcttcccacg cg 22  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 45  
 <400> 4  
 ttagcagccg gatctcagtg 20  
 <210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: etiqueta 6xHis sintética  
 55  
 <400> 5  
 His His His His His His  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 17  
 60

## ES 2 578 103 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 6  
gttgggaagg gcgatcg 17

10 <210> 7  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7  
actttatgct tccggctcgt a 21

20 <210> 8  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

30 <400> 8  
agtac gatcacagtg 15

<210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 9  
tctattgtac tcaactgtgat c 21

<210> 10  
<211> 575  
45 <212> PRT  
<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 10

ES 2 578 103 T3

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
 85 90 95

Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly

ES 2 578 103 T3

130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

ES 2 578 103 T3

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560 565

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 11

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 11

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met

ES 2 578 103 T3

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

ES 2 578 103 T3

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 12  
<211> 575  
<212> PRT

ES 2 578 103 T3

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 12

```

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr
 1           5                10              15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile
 20              25              30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met
 35              40              45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys
 50              55              60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys
 65              70              75

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg
 85              90              95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys
100              105              110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe
115              120              125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly
130              135              140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro
145              150              155

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala
165              170              175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser
180              185              190

```

5



ES 2 578 103 T3

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

ES 2 578 103 T3

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 13

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 13

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Ala Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Thr Trp Ala Leu Gln Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

ES 2 578 103 T3

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Ser Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

ES 2 578 103 T3

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Phe Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 14

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 14

ES 2 578 103 T3

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Ser Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Ser Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Gly Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

ES 2 578 103 T3

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Ala Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Glu Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
 500 505 510

ES 2 578 103 T3

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Arg Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 15

<211> 577

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 15

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

10

ES 2 578 103 T3

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190  
 Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205  
 Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220  
 Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255  
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285  
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300  
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350  
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365  
 Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380  
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415



ES 2 578 103 T3

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Glu Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
 500 505 510

Leu Val Ala Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys Gln  
 565 570 575

Thr

- <210> 16
- <211> 575
- <212> PRT
- <213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 16

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

10

ES 2 578 103 T3

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Glu Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

ES 2 578 103 T3

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 17  
 <211> 575  
 <212> PRT

ES 2 578 103 T3

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 17

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asn Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
 85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

5

ES 2 578 103 T3

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Gly Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly

ES 2 578 103 T3

450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 18

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 18

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

10

ES 2 578 103 T3

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125  
 Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140  
 Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190  
 Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205  
 Glu Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220  
 Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255  
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285  
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300  
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350  
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr

ES 2 578 103 T3

		355								360							365
	Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	
		370					375					380					
	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	
	385					390					395					400	
	Gly	Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	
					405					410					415		
	Gly	Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	
					420				425					430			
	Ile	Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	
			435					440						445			
	Tyr	Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	
		450					455					460					
	Thr	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	
	465					470					475					480	
	Gly	Tyr	Trp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Arg	
					485					490					495		
	Pro	Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Glu	
				500					505					510			
	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Leu	Ser	Val	
			515					520					525				
	Lys	Cys	Ala	Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	
		530					535					540					
	Asn	Phe	Lys	Val	Gly	Phe	Ser	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Lys	Pro	Val	Gln	
	545					550					555					560	
	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Asp	Asp	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys		
					565					570					575		
<210>	19																
<211>	575																
<212>	PRT																
<213>	Fago phi29 de bacillus																
<400>	19																
	Met	Lys	His	Met	Pro	Arg	Lys	Arg	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	
	1				5					10					15		

5

10



ES 2 578 103 T3

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
 85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Thr Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu

ES 2 578 103 T3

	260					265					270				
Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile
		275					280					285			
Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile
	290					295					300				
Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly
305					310					315					320
Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met
				325					330						335
Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
			340					345					350		
Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr
		355					360					365			
Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu
	370					375					380				
Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr
385					390					395					400
Gly	Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu
				405					410					415	
Gly	Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe
				420				425					430		
Ile	Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys
		435					440					445			
Tyr	Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly
	450					455					460				
Thr	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu
465					470					475					480
Gly	Tyr	Trp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Arg
				485					490					495	
Pro	Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Glu
			500					505					510		

ES 2 578 103 T3

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 20

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 20

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala

10

ES 2 578 103 T3

165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Val Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
405 410 415

ES 2 578 103 T3

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 21

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 21

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Thr Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys

10

ES 2 578 103 T3

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

ES 2 578 103 T3

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Glu Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Ala Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
 500 505 510

Leu Ile Ala Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Pro Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Arg  
 565 570 575

<210> 22  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 22

ES 2 578 103 T3

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Glu Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
210 215 220



ES 2 578 103 T3

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

ES 2 578 103 T3

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 23

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 23

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
 85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

10

ES 2 578 103 T3

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
325 330 335

Glu Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
370 375 380

ES 2 578 103 T3

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
500 505 510

Leu Ile Ala Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Pro Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560 565

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Arg  
565 570 575

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 24

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

10

ES 2 578 103 T3

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

ES 2 578 103 T3

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Val Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
500 505 510

Leu Ile Ala Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Pro Asp Arg Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Arg Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Arg  
565 570 575

<210> 25  
<211> 575  
<212> PRT

ES 2 578 103 T3

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 25

```

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Ala Thr
 1          5          10          15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile
          20          25          30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met
          35          40          45

Ala Trp Ala Leu Gln Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys
 50          55          60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys
65          70          75          80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg
          85          90          95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys
          100          105          110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe
          115          120          125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly
          130          135          140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro
145          150          155          160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala
          165          170          175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser
          180          185          190

```

5

ES 2 578 103 T3

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205  
 Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220  
 Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255  
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285  
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300  
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350  
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365  
 Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380  
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415  
 Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430  
 Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445



ES 2 578 103 T3

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 26

<211> 575

<212> PRT

5

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 26

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Ala Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Gln Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

10

ES 2 578 103 T3

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

ES 2 578 103 T3

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Ser Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 27  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus

<400> 27

5

ES 2 578 103 T3

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

ES 2 578 103 T3

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu

ES 2 578 103 T3

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 28

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 28

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

10

ES 2 578 103 T3

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

ES 2 578 103 T3

405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 29  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus

<400> 29

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

5

10



ES 2 578 103 T3

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80  
 Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
 85 90 95  
 Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110  
 Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125  
 Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140  
 Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190  
 Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205  
 Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220  
 Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255  
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285  
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300  
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly

ES 2 578 103 T3

305                                    310                                    315                                    320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
   325    330    335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
   340    345    350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
   355    360    365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
   370    375    380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
   385    390    395    400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
   405    410    415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
   420    425

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
   435    440    445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
   450    455    460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
   465    470    475    480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
   485    490    495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
   500    505    510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
   515    520    525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
   530    535    540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
   545    550    555    560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
   565    570    575

<210> 30

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 30

ES 2 578 103 T3

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr

# ES 2 578 103 T3

```

      210                    215                    220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Ser Lys Glu Lys
225                    230                    235                    240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala
                    245                    250                    255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu
                    260                    265                    270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile
                    275                    280                    285

Arg Cys Gly Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile
290                    295                    300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly
305                    310                    315                    320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met
                    325                    330                    335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys
                    340                    345                    350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr
355                    360                    365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu
370                    375                    380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr
385                    390                    395                    400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu
                    405                    410                    415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe
420                    425                    430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys
435                    440                    445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly
450                    455                    460

```

ES 2 578 103 T3

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 31  
<211> 575  
<212> PRT  
<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 31

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe

10

ES 2 578 103 T3

		115						120								125
Pro	Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	
	130															140
Asp	Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	
	145					150						155				160
Glu	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	
					165										175	
Leu	Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	
																190
Asp	Ser	Leu	Lys	Asp	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	
																205
Lys	Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Lys	Val	Arg	Tyr	
																220
Ala	Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	
																240
Glu	Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	
																255
Gln	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	
																270
Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	
																285
Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	
																300
Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	
																320
Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	
																335
Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	
																350
Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	
																365

ES 2 578 103 T3

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

- <210> 32
- <211> 575
- <212> PRT
- <213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 32

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile

10

ES 2 578 103 T3

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



ES 2 578 103 T3

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

ES 2 578 103 T3

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 33

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 33

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Glu Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

5

10

ES 2 578 103 T3

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Glu Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

ES 2 578 103 T3

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 34  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 34

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

10

ES 2 578 103 T3

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Ser Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Ser Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Val Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Gly Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Lys  
260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
325 330 335

ES 2 578 103 T3

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Ala Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Glu Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Arg Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 35  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus  
 <400> 35

5

ES 2 578 103 T3

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
 50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
 65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
 85 90 95

Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
 100 105 110

Arg Lys Ile His Ala Val Ile Tyr Asp Ser Ser Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190

Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Gly Lys  
 225 230 235 240

ES 2 578 103 T3

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255  
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285  
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300  
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350  
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365  
 Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380  
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415  
 Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430  
 Ile Thr Ala Trp Gly Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445  
 Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460  
 Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480  
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Arg Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495



ES 2 578 103 T3

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys  
500 505 510

Leu Ile Ala Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Pro Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 36

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 36

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

10

ES 2 578 103 T3

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

ES 2 578 103 T3

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 37  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus

5

<400> 37

Met Lys His Met Pro Arg Lys Arg Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
 20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
 35 40 45

10

ES 2 578 103 T3

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Ser Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Ser Lys Lys Leu Pro Phe  
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Val Thr Ala Gly Ser  
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr  
210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Gly Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
290 295 300

ES 2 578 103 T3

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Glu Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
 485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
 565 570 575

<210> 38  
 <211> 575  
 <212> PRT

ES 2 578 103 T3

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 38

```

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr
 1          5          10          15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile
          20          25          30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met
          35          40          45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys
          50          55          60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys
 65          70          75          80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg
          85          90          95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys
          100          105          110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe
          115          120          125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly
          130          135          140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro
145          150          155          160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala
          165          170          175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser
          180          185          190

Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys
          195          200          205

```

5

ES 2 578 103 T3

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285

Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly

ES 2 578 103 T3

450

455

460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 39

<211> 575

<212> PRT

<213> Fago phi29 de bacillus

<400> 39

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile  
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met  
35 40 45

Ala Trp Ala Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys  
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg  
85 90 95

Thr Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys  
100 105 110

5

10



ES 2 578 103 T3

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe  
 115 120 125  
 Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly  
 130 135 140  
 Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser  
 180 185 190  
 Asp Ser Leu Lys Asp Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys  
 195 200 205  
 Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Lys Val Arg Tyr  
 210 215 220  
 Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala  
 245 250 255  
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile  
 275 280 285  
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile  
 290 295 300  
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys  
 340 345 350  
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr

ES 2 578 103 T3

355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu  
370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr  
385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu  
405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe  
420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys  
435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly  
450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu  
465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg  
485 490 495

Pro Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Glu  
500 505 510

Ile Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

<210> 40  
 <211> 575  
 <212> PRT  
 <213> Fago phi29 de bacillus

<400> 40

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr  
1 5 10 15

5

10

ES 2 578 103 T3

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



ES 2 578 103 T3

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Leu Ser Val  
515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu  
530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln  
545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys  
565 570 575

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 que comprende una mutación M8R, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 tiene mayor estabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje, y, opcionalmente, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende adicionalmente al menos una mutación seleccionada de V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.
- 10 2. La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la reivindicación 1, que tiene al menos una de una mayor termoestabilidad de proteínas, que produce una mayor cantidad de producto de amplificación de ADN, vida media más larga, mayor afinidad por el sustrato de ADN, un mayor grado de fidelidad de ADN polimerasa, aumento de la catálisis, o aumento capacidad de procesamiento, en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.
- 15 3. La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, y E221K.
- 20 4. La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende las mutaciones M8R, V51A, M97T, G197D, E221K, Q497P, K512E, y F526L.
- 25 5. La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la reivindicación 3 que tiene el SEQ ID NO: 14.
6. La ADN polimerasa del bacteriófago phi29 de la reivindicación 1, en donde la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje es el SEQ ID NO: 10.
- 30 7. Un método para amplificar un ácido desoxirribonucleico (ADN), comprendiendo el método  
poner en contacto el ADN que va a ser amplificado con una ADN polimerasa del bacteriófago phi29 que  
comprende una mutación M8R, y  
incubar la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 mutante y el ADN en condiciones para dar como  
resultado un ADN amplificado,
- 35 en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 tiene mayor estabilidad de proteínas en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje,  
y, opcionalmente, en donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende adicionalmente al menos una  
mutación seleccionada entre V51A, M97T, L123S, G197D, K209E, E221K, E239G, Q497P, K512E, E515A, y F526L.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, donde las condiciones comprenden una temperatura mayor de 30°C.
9. El método de la reivindicación 7, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende las mutaciones  
M8R, V51A, M97T, G197D, y E221K.
- 45 10. El método de la reivindicación 7, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 comprende las mutaciones  
M8R, V51A, M97T, G197D, E221K Q497P, K512E, y F526L.
- 50 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29  
mutante genera una mayor cantidad de producto de amplificación de ADN en comparación con la ADN polimerasa  
de phi29 de tipo salvaje.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29  
mutante tiene un mayor grado de fidelidad de la ADN polimerasa en comparación con la ADN polimerasa de phi29  
de tipo salvaje.
- 55 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29  
mutante tiene una vida media más larga en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, donde la ADN polimerasa del bacteriófago phi29  
tiene mayor catálisis en comparación con la ADN polimerasa de phi29 de tipo salvaje.

FIG. 1. Sustituciones de residuos de aminoácidos encontrados en clones seleccionados

Gripo 4 M3	13	mutaciones	8M->R, 15T->A, 49A->T, 51V->A, 53K->Q, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 312G->S, 497Q->P, 512K->E, 526F->L, 530Q->F
Gripo 10 M11	13	mutaciones	8M->R, 51V->A, 70I->T, 97M->T, 197G->D, 214L->S, 221E->K, 337K->E, 434T->A, 514V->I, 515E->A, 534T->P, 575K->R
Gripo 12 M14	13	mutaciones	51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 247V->A, 260S->N, 453I->V, 514V->I, 515E->A, 534T->P, 538K->R, 555K->R, 575K->R
Gripo 14 M16	11	mutaciones	8M->R, 15T->A, 51V->A, 53K->Q, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 359L->S, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 18 M24	11	mutaciones	8M->R, 107L->S, 123L->S, 172I->V, 239E->G, 272E->K, 434T->A, 478K->E, 497Q->P, 526F->L, 553K->R
Gripo 13 M15	10	mutaciones	8M->R, 15T->A, 51V->A, 53K->Q, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 16 M20	10	mutaciones	8M->R, 51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 237F->S, 291E->G, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 5 M4	9	mutaciones	8M->R, 107L->S, 123L->S, 239E->G, 434T->A, 478K->E, 497Q->P, 526F->L, 553K->R
Gripo 7 M7	9	mutaciones	51V->A, 57D->N, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 280D->G, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 8 M9	9	mutaciones	8M->R, 51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 246M->T, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 9 M10	9	mutaciones	8M->R, 51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 378I->V, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 11 M13	9	mutaciones	8M->R, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 337K->E, 514V->I, 515E->A, 534T->P, 575K->R
Gripo 17 M23	9	mutaciones	51V->A, 97M->T, 110K->E, 197G->D, 221E->K, 410G->E, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 19 M25	9	mutaciones	8M->R, 117T->A, 123L->S, 239E->G, 437A->G, 490K->R, 514V->I, 515E->A, 534T->P
Gripo 21 M27	9	mutaciones	8M->R, 91N->S, 123L->S, 188M->V, 239E->G, 354K->E, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 2 M1, M6, M8, M12	8	mutaciones	51V->A, 97M->T, 197G->D, 209K->E, 221E->K, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 15 M18	8	mutaciones	51V->A, 97M->T, 186D->G, 197G->D, 221E->K, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 20 M26	8	mutaciones	51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 276V->A, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 3 M2, M17, M19, M21-22, M28-30	7	mutaciones	51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 497Q->P, 512K->E, 526F->L
Gripo 6 M5	7	mutaciones	51V->A, 97M->T, 197G->D, 221E->K, 478K->E, 515E->A, 526F->L
Gripo de tipo salaje	0	mutaciones	

FIG. 2. Elalheamiento CLUSTALW de 30 secuencias de proteínas seleccionadas

wc	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N1	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N2	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N3	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N4	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N5	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N6	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N7	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N8	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N9	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N10	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N11	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N12	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N13	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N14	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N15	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N16	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N17	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N18	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N19	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N20	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N21	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N22	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N23	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N24	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N25	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N26	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N27	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N28	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N29	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM
N30	1	NRHMPRNNYS	CDPFTTKEV	DCRVWAYGYN	NIEDHSEYKI	GNSLDEPNAN	VLRVQADLYF	HLKFDGAFI	IHWLSPNGFK	WSADGLPNTY	NTIISRNGQM









FIG. 3A-F. Comparación de la vida media ( $T_{1/2}$ ) de las actividades entre las variantes de tipo salvaje y mutantes de la ADN polimerasa de phi29

FIG. 3A

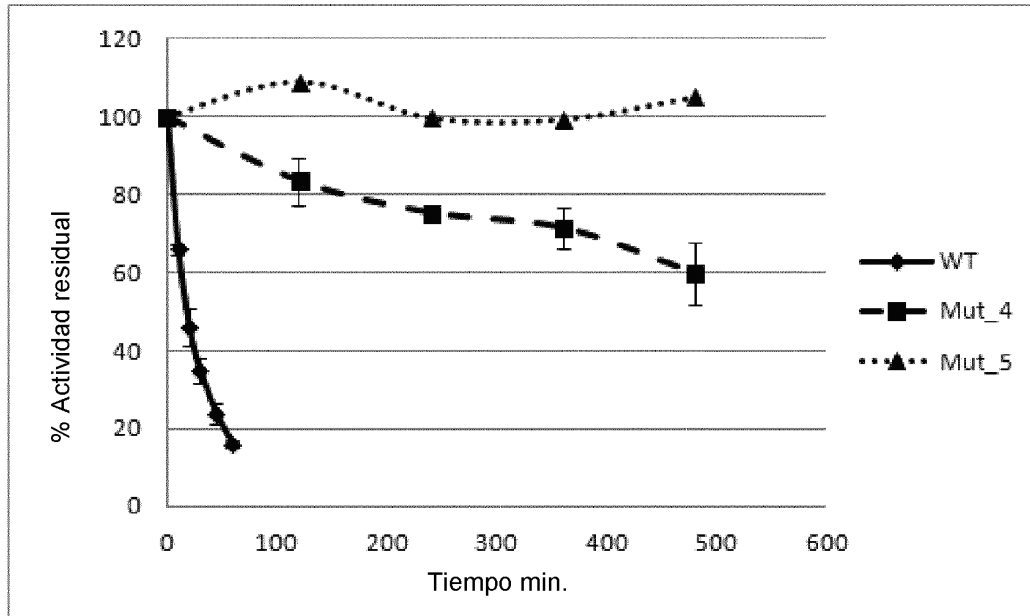


FIG. 3B

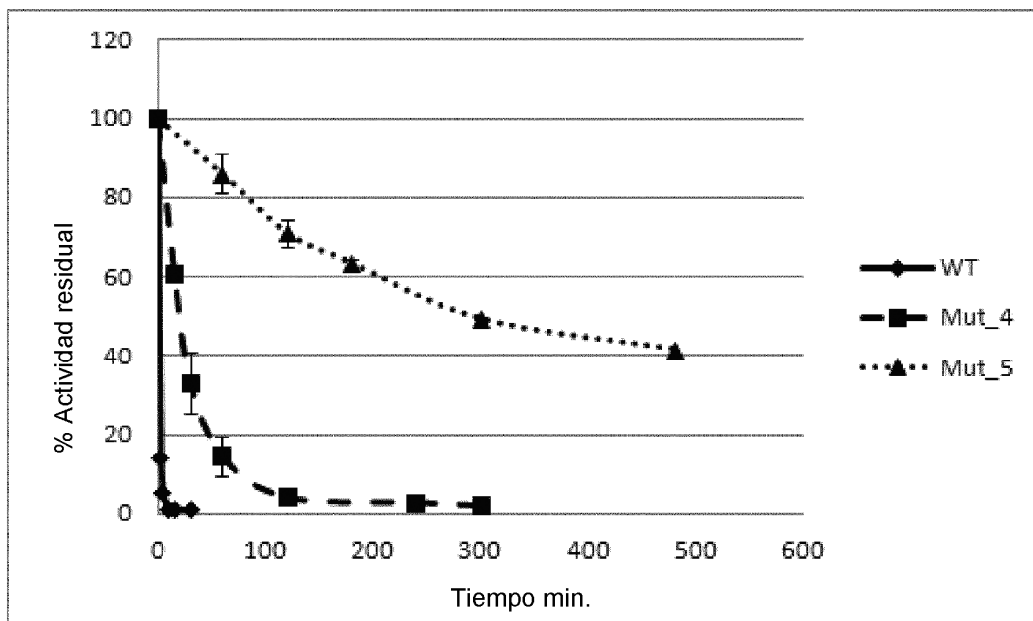


FIG. 3C

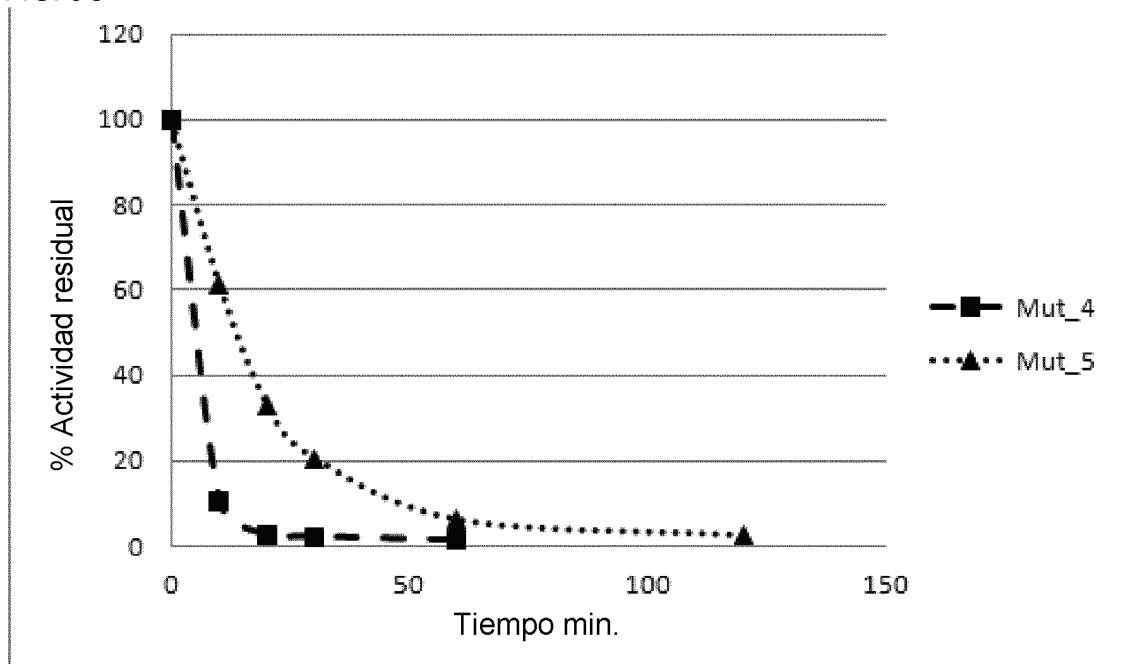


FIG. 3D

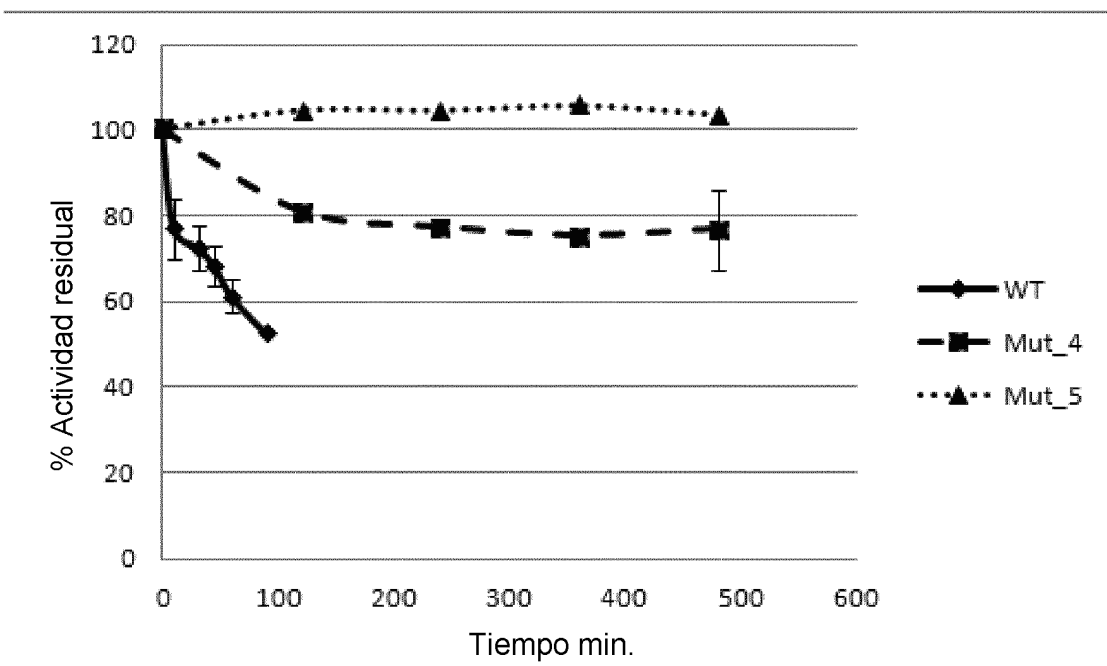


FIG. 3E

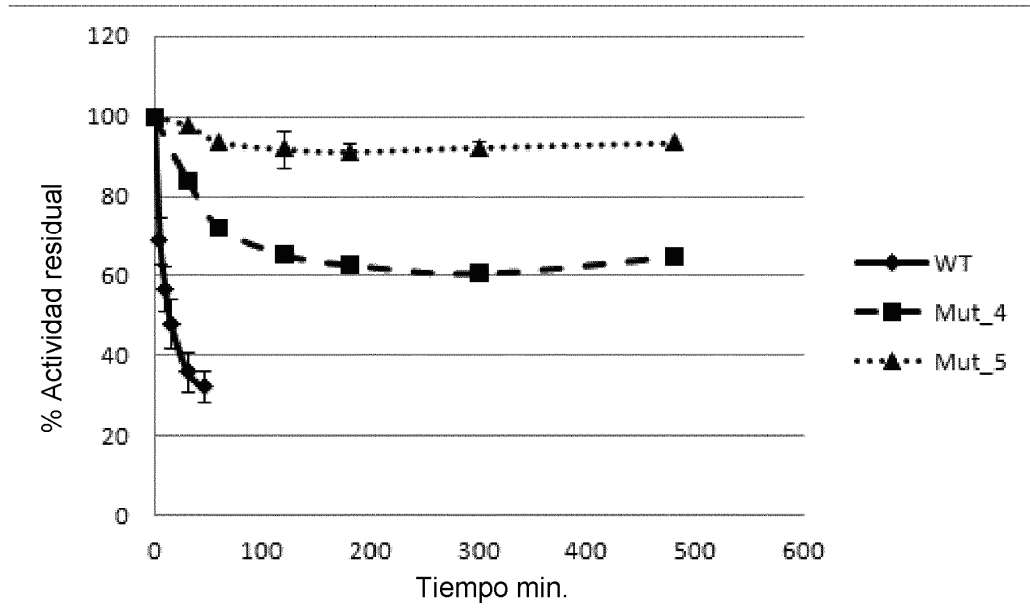


FIG. 3F

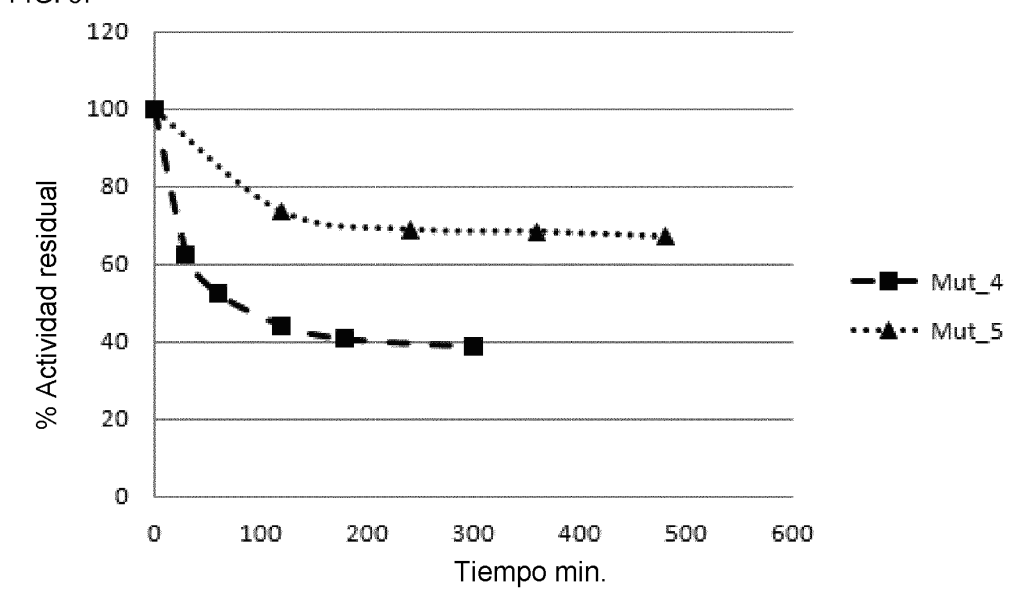


FIG. 4A-B. Comparación de la vida media ( $T_{1/2}$ ) de las actividades entre las variantes de tipo salvaje y mutantes que contienen mutaciones únicas G197D, E221K

FIG. 4A

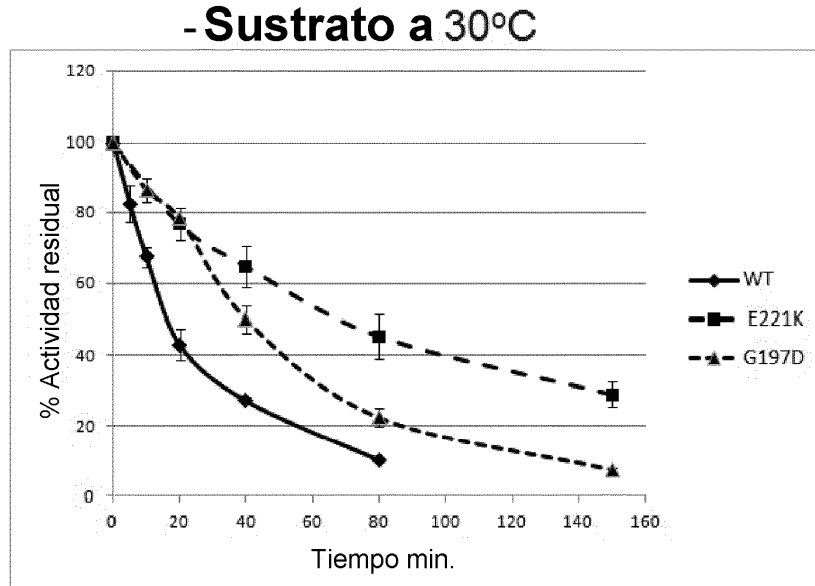


FIG. 4B

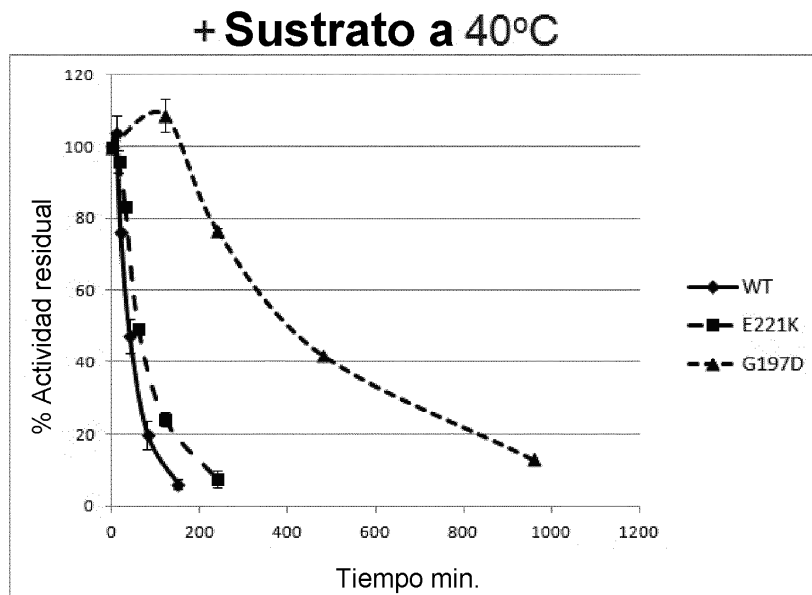


FIG. 5A-C. Comparación de la eficacia de MDA entre variantes de tipo salvaje y mutantes de ADN polimerasa de phi29

FIG. 5A

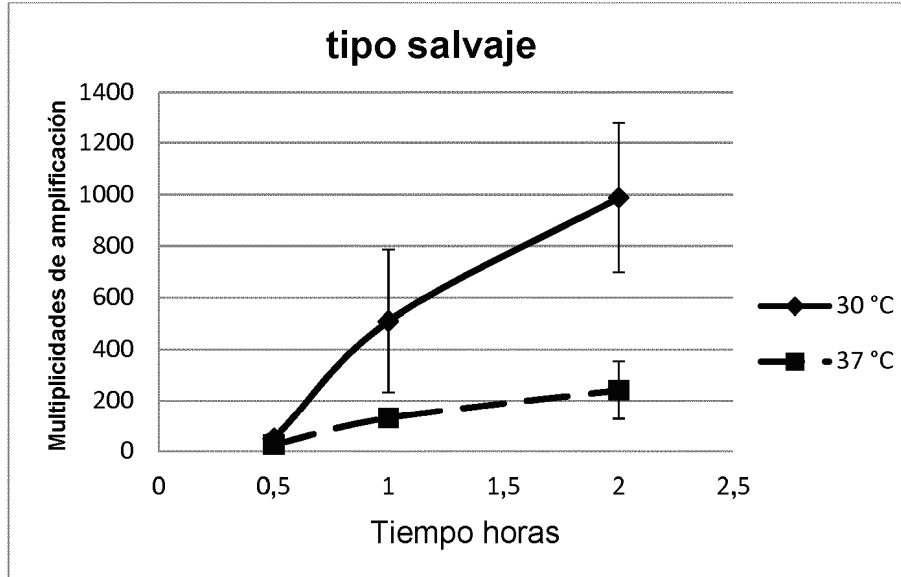


FIG. 5B

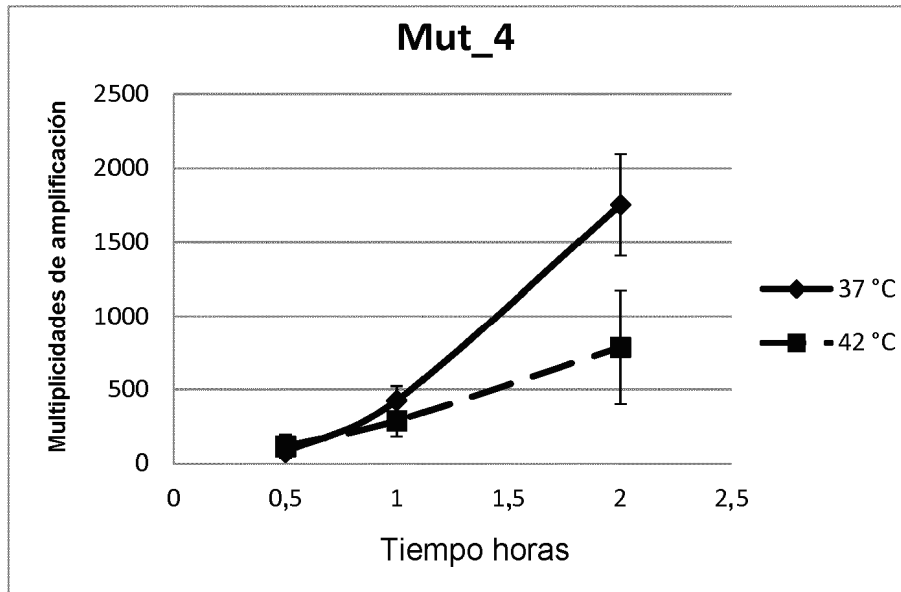


FIG. 5C

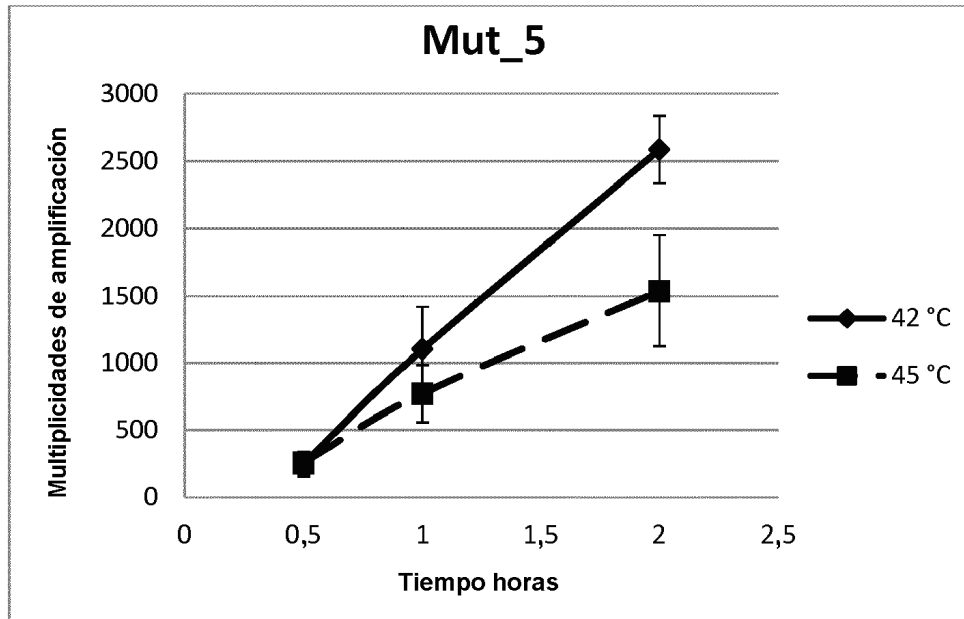




FIG. 6. Uniformidad de cobertura

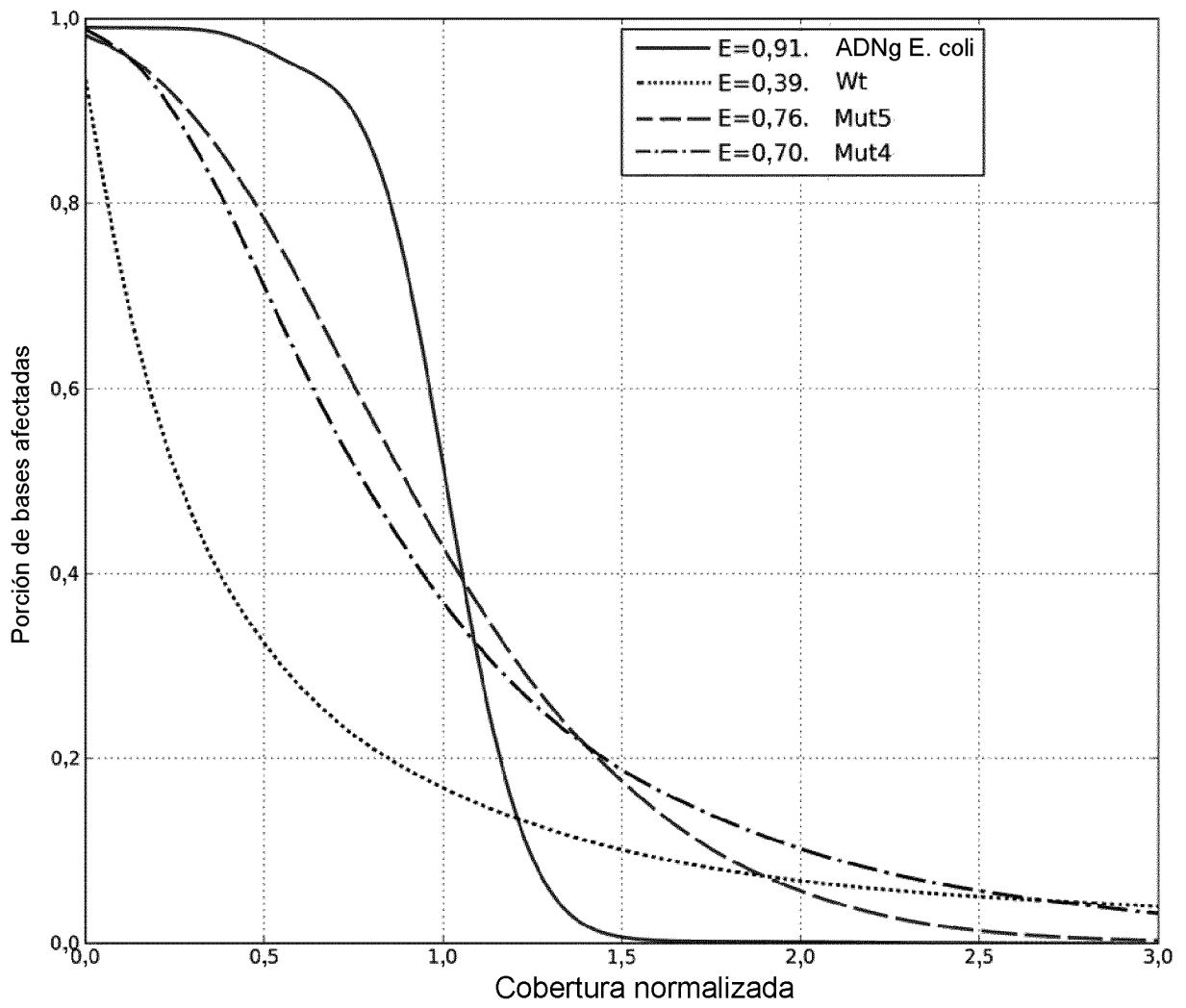


FIG. 7. Contenido de CG de las secuencias leídas

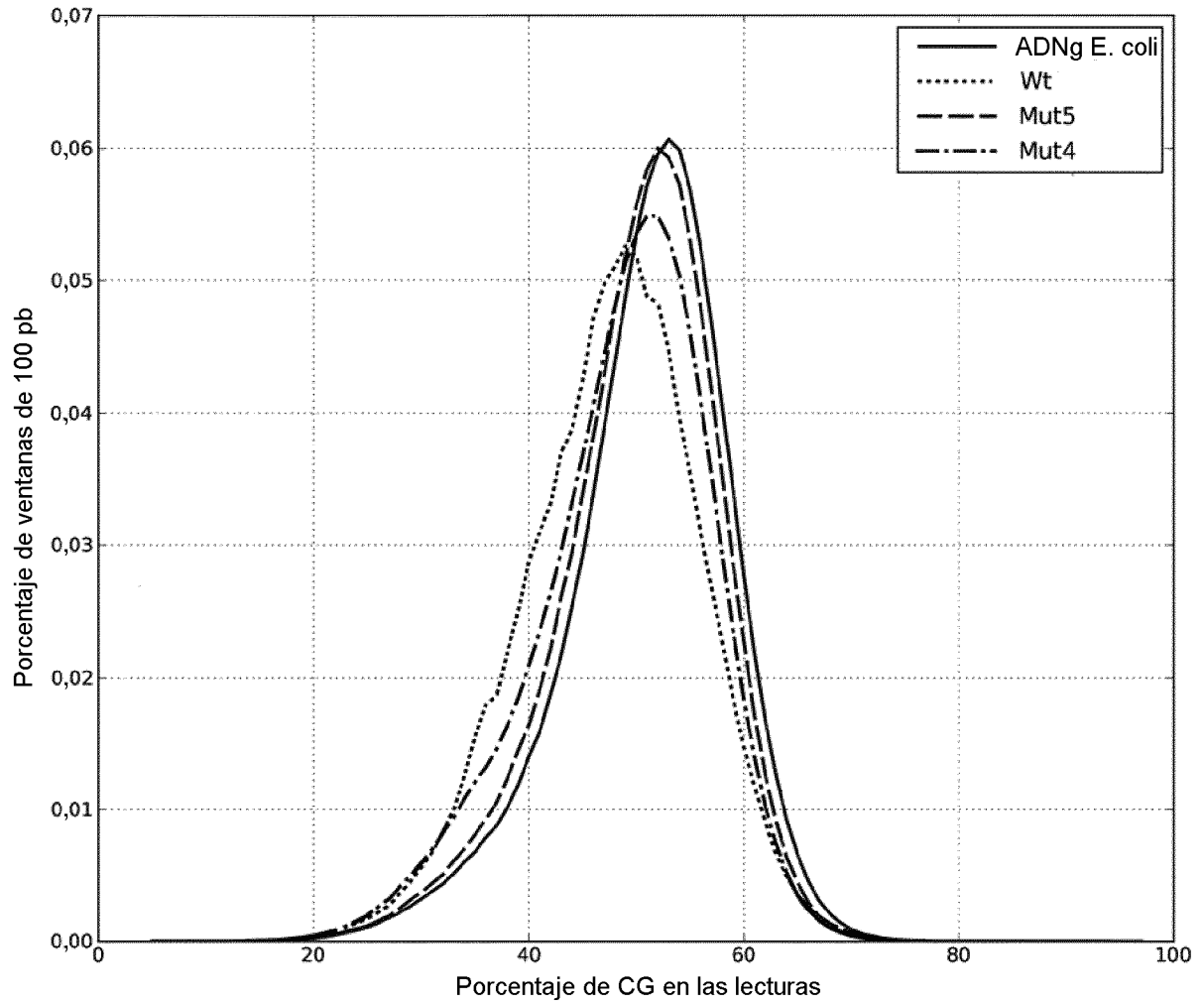


FIG. 8. Análisis de unión a ADN de mutantes de polimerasa de phi29

