

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 906**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2013 PCT/GB2013/050387**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13121228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2013 E 13705249 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2814954**

54 Título: **Endonucleasas**

30 Prioridad:

17.02.2012 GB 201202768

07.09.2012 GB 201216029

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2017

73 Titular/es:

**BIOTEC PHARMACON ASA (100.0%)
Sykehusveien 23
9294 Tromsø, NO**

72 Inventor/es:

**LANES, OLAV;
HAVDALEN, LINDA;
SOLSTAD, TERESE;
LORENTZEN, MARIT;
LEIROS, INGAR;
HELLAND, RONNY y
ALTERMARK, BJORN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 622 906 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

Endonucleasas

5 La presente invención se refiere a endonucleasas que se inactivan por condiciones de tratamiento suaves, en particular que muestran propiedades termolábiles. La invención también comprende la eliminación de polinucleótidos contaminantes de una preparación biológica mediante el uso de una endonucleasa tal. La invención también se refiere a la prevención de resultados positivos falsos en reacciones de amplificación de ácido nucleico mediante el uso de una endonucleasa, en particular reacciones de amplificación que implican un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10 Los ácidos nucleicos, y especialmente el ADN genómico, frecuentemente poseen un problema en cultivos celulares, lisados celulares y purificación y análisis de proteínas, ya que crea viscosidad en la muestra o interfiere con la purificación, análisis aguas abajo o aplicaciones. La eliminación de ADN y ácido nucleico puede hacerse físicamente, químicamente o enzimáticamente. La eliminación enzimática de ADN y ARN puede lograrse añadiendo nucleasas.

15 Sin embargo, las nucleasas frecuentemente dejan de degradar el ADN en muestras biológicas complejas, debido a que el ADN está unido a proteínas u otras moléculas que lo protegen de la degradación enzimática. Frecuentemente se añade cloruro sódico a tampones de lisis de células típicos para limitar las interacciones proteína-ADN, y así facilitar la eliminación de ADN en la purificación de proteínas aguas abajo. Desafortunadamente, la mayoría de las nucleasas llegan a ser altamente inhibidas o a inactivarse a concentraciones de sal moderadas, frecuentemente haciendo ineficiente la eliminación enzimática. Así, la eliminación de todas las trazas de ADN de proteínas, reactivos o muestras biológicas es frecuentemente problemática.

20 Existen varias alternativas comerciales a eliminar enzimáticamente ácidos nucleicos en lisados celulares, purificación de proteínas y antes de etapas analíticas, tales como Benzonase (nucleasa de *Serratia marcescens*), Omnicleave (Epicentre) o DNasa I. Sin embargo, no hay opción que pueda ser inactivada por tratamiento térmico moderado. Para eliminar la enzima anterior después de uso, normalmente se necesitan diversas resinas, inhibidores o etapas de purificación en columna. Esto hace que un método enzimático sea más problemático de usar ya que se necesita un reactivo adicional o etapa de purificación para eliminar la nucleasa después de uso. Esto requiere más tiempo y puede conducir a rendimiento más bajo de la proteína de interés.

25 Los problemas con la eliminación de trazas de ADN en la purificación de proteínas o de reactivos son evidentes en el ADN endógeno frecuentemente encontrado en polimerasas comerciales y mezclas madre. Además, los reactivos para aplicaciones de biología molecular (por ejemplo, PCR y secuenciación) y diagnósticos moleculares tienen que estar libres tanto de ADN contaminante como de nucleasas. Las dificultades asociadas a eliminar las nucleasas descritas anteriormente después de uso las hacen menos adecuadas para la purificación de los reactivos usados para las tecnologías de ADN.

30 Las técnicas de amplificación de ácido nucleico, tales como PCR, son una de las herramientas más poderosas disponibles en la biotecnología, que permiten la preparación de un gran número de copias de una secuencia diana a partir de una muestra que contiene solo una pequeña cantidad de ácido nucleico. En el caso de PCR, se añaden cebadores de oligonucleótidos complementarios a sus hebras respectivas de una secuencia diana bicatenaria a la mezcla de reacción que contiene la secuencia diana y los nucleótidos libres. El ciclado térmico en presencia de una ADN polimerasa produce la amplificación de la secuencia entre los cebadores. La capacidad de los fragmentos amplificados creados por el proceso de PCR para actuar de moldes para los posteriores ciclos de PCR produce la rápida producción de una cantidad considerable de la secuencia diana.

35 Reacciones de amplificación de susceptibilidad particular para los efectos perjudiciales de la contaminación de ácido nucleico son las técnicas de PCR cuantitativa (qPCR), ya que éstas tienen la potencia de cuantificar menos de 20 copias de una secuencia de ADN en una reacción. Así, incluso los niveles más pequeños de contaminación de ácido nucleico pueden dar resultados falsos en técnicas de qPCR. Además, estos métodos requieren la detección de señales de los ácidos nucleicos diana amplificados por encima de una señal de fondo inevitable. El ácido nucleico contaminante puede contribuir a esta señal de fondo y así reducir la sensibilidad de la técnica. Como tal, el minimizar el ácido nucleico contaminante maximiza la sensibilidad de un experimento de PCR cuantitativa. En experimentos donde se detectan números pequeños de copias de ácidos nucleicos diana, por ejemplo diagnósticos de patógenos basados en PCR cuantitativa y cuantificación de carga de patógenos, es primordial que la sensibilidad de la PCR cuantitativa se maximice y se minimicen los positivos falsos. En el campo de la identificación de bacterias y los diagnósticos donde segmentos de ADN bacteriano altamente conservados son elegidos como diana (por ejemplo, genes 16SARNr o 23SARNr) por técnicas de qPCR, la contaminación de ácido nucleico que surge de la preparación de ADN polimerasa (que normalmente se obtiene de bacterias y sistemas de expresión bacterianos) es un problema importante. Por tanto, se necesitan métodos de eliminación de contaminantes de ácido nucleico bacteriano eficientemente de preparaciones de ADN polimerasa. Especialmente se buscan métodos que pueden lograr esto sin tener un impacto perjudicial sobre las reacciones de amplificación aguas abajo y sin dañar la polimerasa.

- Se ha sugerido que pueden tratarse mezclas de reacción de PCR individuales antes de la adición del ADN diana y ADN polimerasa *Taq* usando endonucleasas que cortan internas a la secuencia diana, previniendo así la amplificación de ADN contaminante (Furrer et al. Nature. Vol. 346 página 324, 1990). Este método requiere un tiempo de descontaminación de 30 minutos, y con el fin de inactivar la endonucleasa después de la descontaminación la mezcla de reacción se hierve. Debido a esta etapa de hervir, es necesario añadir la ADN polimerasa después de la descontaminación. Por supuesto, esto representa otro riesgo de introducción de remanente en la mezcla de pre-amplificación y se descarta la descontaminación de la propia ADN polimerasa.
- Se han descrito endonucleasas termolábiles que descomponen el ADN específicamente (DNasas). El documento WO 99/007887 desvela una DNasa aislada de *Pandalus borealis* que se inactiva de forma sustancialmente irreversible después de 2 minutos a 94 °C. Esta misma enzima se inactiva de forma sustancialmente irreversible después de 15 minutos a 65 °C. Sin embargo, estas temperaturas son demasiado altas para ciertas aplicaciones y también se desea la eliminación de ARN contaminante y ADN monocatenario (ADNmc).
- La endonucleasa I es una enzima monomérica periplásmica o extracelular de ≈ 25 kDa que escinde tanto ARN como ADN en un modo independiente de secuencia. Se encuentra en muchas proteobacterias diferentes y en *Fibrobacter*. La estructura tiene una topología alfa/beta mixta que contiene nueve hebras beta, cinco hélices cortas y cinco largas. Es capaz de escindir plásmidos y ADNmc. Escinde en el lado 3' del enlace fosfodiéster.
- Altermark et al. (FEBS Journal; 2007, 274: 252 a 263) han descrito en la materia endonucleasas que son termolábiles. Describen la endonucleasa I aislada de la bacteria psicrófila *Vibrio salmonicida* (VsEndA, SEQ ID NO: 1). Se encontró que la enzima tenía una actividad enzimática de menos del 20 % de actividad (en comparación con la actividad óptima de esta enzima) a una temperatura de 50 °C, en comparación con casi el 100 % de actividad bajo las mismas condiciones encontradas en la endonucleasa I aislada de la bacteria mesófila *Vibrio cholerae* (VcEndA, SEQ ID NO: 3). Además, la tasa de despliegue irreversible a 70 °C fue más alta para VsEndA que para VcEndA.
- Se ha informado que VsEndA y VcEndA descritas anteriormente son enzimáticamente más activas en soluciones de alta salinidad, debido a las características moderadamente halófilas de las bacterias *V. salmonicida* y *V. cholerae*. Niiranen et al. (FEBS Journal; 2008, 275: 1593 a 1605) muestran que la constante catalítica (k_{cat}) alcanza el pico a una concentración de sales de 0,25 M y 0,5 M para las enzimas VcEndA y VsEndA, respectivamente.
- Una endonucleasa que puede inactivarse a temperaturas suaves y que no afecta perjudicialmente la actividad de la proteína, u otra molécula de interés en la preparación, proporcionaría un método altamente eficaz y eficiente de eliminación de polinucleótidos contaminantes de una preparación biológica. Idealmente, esta endonucleasa también sería capaz de tolerar preparaciones que contuvieran un alto nivel de salinidad, debido a que frecuentemente se añade cloruro sódico a las preparaciones con el fin de limitar las interacciones ADN-proteína y producir una muestra de proteínas más pura después de la adición de la endonucleasa. Sin embargo, no hay endonucleasa actualmente disponible con estas propiedades.
- La inactivación de la nucleasa que no se invierte por cambios en la temperatura es especialmente importante para preparaciones que van a usarse en métodos adicionales que pueden realizarse a temperatura ambiente, o incluyen ciclos con un componente de temperatura ambiente. La simple termolabilidad, es decir, despliegue a una temperatura más baja que las enzimas existentes, es insuficiente. Necesita combinarse inactivación en condiciones suaves, por ejemplo temperaturas bajas, con un rendimiento razonable de proteína correctamente plegada en la síntesis inicial con el fin de proporcionar una enzima útil.
- Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una única mutación puntual en la secuencia de aminoácidos de la enzima VsEndA produce una enzima que sigue siendo enzimáticamente activa, incluso en preparaciones de alta salinidad, y todavía puede inactivarse con condiciones suaves. El resto cuya sustitución produce una enzima con propiedades sorprendentes y ventajosas es un resto de serina encontrado en la posición 44. Este resto de serina reside inmediatamente en el extremo N de un motivo de pentapéptido altamente conservado (fenilalanina-tirosina-cisteína-glicina-cisteína, o Phe-Tyr-Cys-Gly-Cys, o FYCGC). La secuencia de VsEndA no mutante (wt) se representa por SEQ ID NO: 1 y se muestra en Fig. 1. La numeración (44) incluye un péptido señal del extremo N que se escinde durante el transporte del citoplasma al periplasma. La secuencia señal no se muestra en las Fig. 3 y 4 y, por consiguiente, la numeración en aquellas figuras está ajustada.
- A partir de los hallazgos de Altermark et al. (Biological Crystallography; 2006, D62, 1387 a 1391) se ha determinado que este resto de serina forma parte de un complejo con un ion cloruro enterrado. Este resto de serina puede encontrarse en posiciones variables dependiendo de la especie de bacteria de la que deriva la endonucleasa I (por ejemplo, el resto de serina equivalente en VcEndA se encuentra en la posición 42 y el resto de serina equivalente en la endonucleasa I derivada de *V. vulnificus* se encuentra en la posición 41). A partir de estudiar las secuencias de las endonucleasas derivadas de diversas bacterias del género *Vibrio*, se ha encontrado que el aminoácido que interacciona con el ion cloruro en la posición de secuencia 40 a 50 no es siempre una serina. En la endonucleasa derivada de *V. furnissii*, por ejemplo, el aminoácido equivalente es una treonina.
- Altermark et al., (2008) Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography vol. 64, N.º 4, páginas 368-376,

desvelan una endonucleasa I de *Vibrio salmonicida*.

Los presentes inventores han encontrado que la sustitución de este resto de serina con un resto con carga negativa conduce a una enzima que tiene las propiedades anteriores.

La presente invención proporciona una endonucleasa I o fragmentos enzimáticamente activos de la misma, métodos para el aislamiento y la purificación de los mismos, composiciones que comprenden los mismos y una segunda endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma, métodos de eliminación de polinucleótidos contaminantes de una muestra, y moléculas de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Así, según la presente invención, se proporciona una endonucleasa I o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, teniendo dicha endonucleasa I la secuencia de SEQ ID NO: 4 o una secuencia que es al menos el 70 % idéntica a la misma, pero en la que el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC ha sido sustituido con un resto que tiene carga negativa, siendo dicha endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma sustancialmente inactivada (irreversiblemente) cuando se incubaba a 30 °C durante 15 minutos en presencia de ditioneitol (DTT) 10 mM.

Alternativamente, la presente invención proporciona una endonucleasa I o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, teniendo dicha endonucleasa I la secuencia de SEQ ID NO: 4 o una secuencia que es al menos el 70 % idéntica a la misma, pero en la que el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC ha sido sustituido con un resto que tiene carga negativa, en la que dicha endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo se inactiva sustancialmente (irreversiblemente) cuando se incubaba a 4 °C durante 6 horas en presencia de tanto DTT 10 mM como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM. Se aprecia que condiciones de inactivación apropiadas son un reflejo de la temperatura, tiempo de incubación y una concentración de cualquier desestabilizador químico añadido. Las condiciones anteriores proporcionan pruebas que definen las enzimas de la invención y además se describen conjuntos de condiciones y protocolos de ensayo completos en los ejemplos.

Se desvela una endonucleasa I o un fragmento enzimáticamente activo de la misma que se inactiva sustancialmente (irreversiblemente) cuando se incubaba a 30 °C durante 15 minutos en presencia de DTT 10 mM, o cuando se incubaba a 4 °C durante 6 horas en presencia de tanto DTT 10 mM como TCEP 10 mM.

Así, aunque las condiciones que proporcionan la inactivación pueden variar, la naturaleza de la sustitución preferida es la misma y así, visto alternativamente, la invención proporciona una endonucleasa I o un fragmento enzimáticamente activo de la misma que es al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, 90 %, 95 % o el 98 %, idéntico a SEQ ID NO: 4, pero en el que el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC ha sido sustituido con un resto que tiene carga negativa.

El resto con carga negativa puede estar tanto genéticamente codificado como no genéticamente codificado. Preferentemente, el aminoácido introducido tiene carga negativa. La polaridad y carga en el contexto de los aminoácidos, y en particular sus grupos funcionales de la cadena lateral, son muy entendidos en la materia y normalmente se evalúan con condiciones fisiológicas normales.

Por "sustitución" del resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC se indica que este resto está sustituido con un aminoácido diferente, normalmente genéticamente codificado, pero posiblemente un aminoácido no genéticamente codificado o derivado de aminoácido. Preferentemente, el resto, que normalmente es serina, está sustituido con un aminoácido con carga negativa, tal como ácido glutámico o ácido aspártico. Alternativamente, dicho resto de aminoácido se sustituye con un aminoácido no genéticamente que tiene carga negativa. Aminoácidos no genéticamente codificados preferidos son derivados de ácido glutámico tales como ácido 4-fluoro-DL-glutámico ácido γ -carboxi-DL-glutámico y ácido D-2-aminoadípico. En la realización más preferida, el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC se sustituye con ácido glutámico.

En una realización preferida, la endonucleasa I o fragmento enzimáticamente de la invención se inactiva sustancialmente cuando se incubaba durante 30 minutos a 50 °C en presencia de TCEP 0,5 mM y la actividad residual se evalúa en presencia de TCEP 0,5 mM; preferentemente, la endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma se inactiva irreversiblemente bajo estas condiciones.

En un aspecto adicional, la invención comprende un método de eliminación de polinucleótidos contaminantes de una muestra que comprende el uso de la endonucleasa descrita anteriormente. El método comprenderá poner en contacto la muestra con una endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, la muestra es una preparación que contiene una proteína de interés, por ejemplo una proteína de interés recombinantemente producida, por ejemplo una enzima. Alternativamente, la proteína de interés puede ser un analito u otra proteína que se desea purificar de un material de partida. La preparación puede ser o derivar de un lisado celular o muestra de tejido o líquido corporal.

La proteína de interés puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La proteína (por ejemplo anticuerpo)

podría ser útil en métodos de diagnóstico o terapéuticos. Así, el método anteriormente descrito puede usarse con el fin de garantizar que la proteína de diagnóstico o terapéutica esté libre de polinucleótidos contaminantes de manera que pueda ser segura de administrar.

5 La proteína de interés puede ser una proteína de unión a ADN u otra proteína que se asocia con ácido nucleico en solución. En particular, tales proteínas para las que la sal puede usarse convenientemente para separar la proteína de interés del ácido nucleico, dada la capacidad observada de la endonucleasa de la invención para funcionar en presencia de sal.

10 La endonucleasa de la invención puede ser particularmente eficaz a concentraciones de sal (por ejemplo, cloruro sódico o cloruro de potasio) de 50 mM a 1 M, preferentemente aproximadamente 500 mM. Muchas nucleasas se inhiben a las altas concentraciones de cloruro sódico normalmente añadidas a los tampones de lisis y purificación de células y la tolerancia de sal de las endonucleasas de la presente invención es una ventaja particular. Preferentemente, las endonucleasas de la presente invención tienen una actividad catalítica óptima (como se evalúa en el presente documento) a cloruro sódico 0,5 M o cloruro de potasio o una actividad a esta concentración de sal que es no inferior al 60 %, preferentemente no inferior al 75 % de la presentada a la concentración de sal óptima. La "concentración de sal óptima" es la concentración de cloruro sódico a la que la enzima tiene su actividad catalítica más alta. Visto alternativamente, las endonucleasas de la invención tienen una actividad catalítica óptima cuando la concentración de cloruro sódico es 0,35 a 0,65 M, preferentemente 0,45 a 0,55 M, más preferentemente aproximadamente 0,5 M.

En otra realización, la preparación biológica es una solución de reactivo, por ejemplo que se usa en una técnica de análisis de polinucleótidos, tal como PCR, secuenciación de ADN/ARN o micromatrices. La solución de reactivo puede comprender o consistir en un componente no de proteína o mezcla, tal como una mezcla madre para PCR o una solución de tampón. La endonucleasa descrita anteriormente podría usarse para eliminar cualquier contaminación de polinucleótidos del reactivo, desactivarse, y entonces dicho reactivo se aplica a una muestra que contiene el polinucleótido de interés, reduciéndose así la probabilidad de contaminación que se introduce a una muestra mediante la adición de dicho reactivo.

30 La invención tiene utilidad en la prevención o limitación de la contaminación con polinucleótidos, y en particular en la prevención o reducción de resultados positivos falsos y la reducción de fondo (controles no de molde positivos) debido a polinucleótidos endógenos en reactivos y enzimas de amplificación.

Las endonucleasas de la invención son adecuadas para su uso en la eliminación o reducción de ADN endógeno en reacciones de amplificación. Esto es debido a que cuanto más baja sea la temperatura de inactivación de la endonucleasa, más fácil es inactivarla durante el proceso de amplificación y mayor es el grado de inactivación que puede lograrse a cualquier temperatura dada usada en la etapa de inactivación.

La endonucleasa de la invención se usa así para degradar polinucleótidos no diana presentes en la mezcla de reacción de amplificación o los componentes individuales de la misma, por ejemplo una polimerasa. Así, no puede reducirse o evitarse la amplificación específica.

45 Como la endonucleasa de la invención puede inactivarse a bajas temperaturas, en una realización preferida, la endonucleasa se usa para eliminar polinucleótidos contaminantes de una solución que contiene una proteína o reactivo de interés, en la que dicha proteína o reactivo es por sí mismo termolábil a temperaturas superiores a 37 °C (la temperatura a la que la endonucleasa es enzimáticamente activa).

La inactivación de la endonucleasa de la invención normalmente comprenderá la incubación de la endonucleasa con un aditivo de inactivación. El aditivo de inactivación desestabiliza la endonucleasa, es decir, la convierte en más susceptible al despliegue a una temperatura dada. La endonucleasa I contiene un Mg^{2+} coordinado y múltiples enlaces disulfuro y el experto conocerá agentes que pueden dirigirse a estas u otras propiedades de la enzima para desestabilizarla.

Debido al ion Mg^{2+} coordinado dentro de la endonucleasa, la concentración de iones Mg^{2+} pueden ser de importancia en la actividad de la endonucleasa. Por este motivo, una concentración de Mg^{2+} o iones Mn^{2+} de entre 1 y 20 mM, preferentemente 5 a 10 mM, puede usarse en los métodos de la invención. Un tampón de PCR o de purificación de proteínas normalmente tiene una concentración de ion Mg^{2+} de 5 mM en forma de cloruro de magnesio.

60 El aditivo de inactivación puede ser un agente quelante de ion metálico, tal como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). El aditivo de inactivación también puede ser un agente reductor de enlaces disulfuro (es decir, un agente que inhibe y/o rompe los enlaces disulfuro entre dos o más restos de cisteína en una proteína). Ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, DTT, 2-mercaptoetanol (también conocido como β -mercaptoetanol), 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y N-etilmaleimida. Se prefieren TCEP y DTT, TCEP es especialmente preferido. El experto sería capaz de determinar las concentraciones apropiadas de agente reductor de enlace disulfuro para sus necesidades que mejoraran la inactivación, pero no fueran perjudiciales para sus

reacciones aguas abajo. Por ejemplo, puede incorporarse convenientemente DTT en la etapa de inactivación a una concentración de entre 0,05 y 50 mM.

5 Preferentemente, la inactivación de la endonucleasa en los métodos de la invención se produce a una concentración de aditivo de inactivación (por ejemplo DTT) de entre 0,5 y 50 mM, más preferentemente entre 1 y 20 mM, por ejemplo 5-20 mM.

Así, preferentemente, el aditivo de inactivación está presente a una concentración de al menos 1 mM.

10 Como se muestra en los ejemplos, las condiciones requeridas para la inactivación representan una combinación flexible de temperatura y tiempo de incubación y concentración de aditivo de inactivación. Así, la inactivación puede lograrse a 40 °C con TCEP 1 mM después de 5-10 minutos de incubación, o a 30 °C con DTT 10 mM durante 15 minutos. Será evidente para el experto, dependiendo de la naturaleza de la preparación biológica que va a tratarse y de los usos posteriores de la misma, que la combinación de condiciones es apropiada. Las endonucleasas de la invención son termolábiles, pero debe apreciarse de lo anterior que puede no ser necesario calentar la enzima con el fin de inactivarla.

20 Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de eliminación de ácido nucleico (contaminación) de una muestra que comprende poner en contacto la muestra con una endonucleasa de la invención en condiciones que permitan la digestión de cualquier polinucleótido en su interior y entonces poner en contacto dicha muestra y mezcla de endonucleasa con un aditivo de inactivación a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar dicha endonucleasa.

25 Las dos etapas de poner en contacto normalmente serán incubaciones y se describen en el presente documento, en particular en los ejemplos. Condiciones de incubación adecuadas para lograr la digestión de ácidos nucleicos en la muestra se conocen en la técnica y pueden comprender convenientemente la incubación a 10-50 °C, por ejemplo a o aproximadamente 35-37 °C durante 5-30 minutos, por ejemplo 10-20 minutos, preferentemente aproximadamente 15 minutos.

30 Como se describe en cualquier parte en el presente documento, las condiciones de incubación para la inactivación pueden variar considerablemente, a temperaturas por debajo de 10 °C la incubación puede ser durante 1-24 horas, a temperaturas de 10-30 °C la incubación puede ser durante 10 minutos a 2 horas y a temperaturas por encima de 30 °C (por ejemplo 30-70 °C, más preferentemente 40 °C), la incubación normalmente será durante 5-30 minutos. Como se muestra en los ejemplos en el presente documento, la concentración y elección del aditivo de inactivación también afectarán los tiempos de incubación/temperatura. Los aditivos de inactivación se usarán preferentemente a las bajas temperaturas de incubación anteriormente mencionadas.

40 Se desvela el uso de la endonucleasa de la invención en la eliminación de contaminación de ácido nucleico de una mezcla de reacción de amplificación o reactivo.

45 Se desvela un método de prevención o reducción de resultados positivos falsos debido al remanente en las reacciones de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo dicho método usar la endonucleasa de la invención para degradar los polinucleótidos no diana remanentes presentes en la mezcla de reacción de amplificación, o los componentes individuales de la misma.

50 La endonucleasa de la presente invención también puede usarse para eliminar contaminantes de ácido nucleico de preparaciones de ADN polimerasa, además de ser usada para eliminar contaminantes de ácido nucleico de mezclas de reacción de amplificación que comprenden una ADN polimerasa. La baja temperatura de inactivación de la endonucleasa de la presente invención significa que la inactivación de la endonucleasa después de la descontaminación puede lograrse sin un impacto perjudicial sobre la polimerasa.

55 El término "reacción de amplificación de ácido nucleico" se refiere a cualquier medio *in vitro* para aumentar el número de copias de una secuencia diana de ácido nucleico. Preferentemente, los métodos implicarán "ciclado térmico, es decir, que implican ciclos de alta temperatura. Los métodos de amplificación incluyen, pero no se limitan a, PCR y modificaciones a la misma, 3SR, SDA, LAR o LCR y LAMP y modificaciones a los mismos. PCR, LAMP y LCR y sus modificaciones son métodos de ciclado térmico. Los métodos pueden producir un aumento lineal o exponencial en el número de copias de la secuencia diana. "Modificaciones" engloban, pero no se limitan a, amplificación en tiempo real, amplificación cuantitativa y semi-cuantitativa, amplificación competitiva, etc.

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

65 El término "mezcla de reacción de amplificación" se refiere a cualquier solución, generalmente acuosa, que comprende los diversos reactivos usados para amplificar un ácido nucleico diana. Éstas incluyen enzimas, tampones acuosos, sales y trifosfatos de nucleósido. El término se refiere a mezclas que contienen todos los componentes

necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación satisfactoria y a mezclas que están incompletas y, por tanto, solo contienen algunos (por ejemplo al menos 2, 3 o 4) de los componentes requeridos. Si va seguido del término "completa", la mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios para la amplificación.

5 El término "remanente" se usa para describir cualquier ácido nucleico que sea accidentalmente o involuntariamente introducido en una mezcla de reacción, en particular secuencias diana llevadas de las reacciones de amplificación previas.

10 El término "resultado positivo falso" se refiere a un resultado que parece mostrar que la muestra de ácido nucleico en investigación contiene la secuencia diana, pero en la que el producto amplificado se deriva de remanente. Claramente, la reducción en ADN contaminante que la invención proporciona es particularmente ventajosa en los campos forense y de diagnóstico. Los métodos de la invención permiten aumentar la especificidad y sensibilidad de la amplificación de ácido nucleico.

15 El término "endonucleasa" se refiere a una enzima que hidroliza un enlace fosfodiéster en el esqueleto de polinucleótido y no es específica de secuencia de nucleótidos. La "endonucleasa I" de la presente invención puede escindir polinucleótidos bc y mc, ADN y ARN.

20 El término "polinucleótido" se refiere a cualquier cadena de nucleótidos. Estos polinucleótidos pueden ser ARN o ADN, y pueden ser tanto bicatenarios como monocatenarios. Las hebras también pueden ser tanto lineales como superenrolladas.

25 El término "sal" se refiere a cualquier compuesto iónico que resulte de la reacción de neutralización de un ácido y una base. Sales que son de interés son aquellas que se usan comúnmente para limitar las interacciones ADN-proteína y producen una muestra de proteína más pura después de la adición de una endonucleasa, y el experto conocería estas sales. Sales de importancia particular son cloruro sódico y cloruro de potasio.

30 Por "sustancialmente inactivada" se indica que la enzima está inactivada al menos el 95 %, preferentemente está inactivada el 98 %, más preferentemente la enzima está inactivada el 100 %. El porcentaje de inactivación puede medirse convenientemente incubando una muestra de ADN (por ejemplo, producto de PCR de 500 pb) durante 3 horas tanto con una endonucleasa inactivada como con una endonucleasa no inactivada en un tampón adecuado (por ejemplo, Tris, HEPES, PBS) a 37 °C; separando los productos de reacción en un gel de bromuro de etidio-agarosa por electroforesis y midiendo las intensidades relativas de fluorescencia de las bandas de ADN relevantes bajo luz UV. Métodos alternativos podrían ser ideados por el experto para medir actividades relativas de endonucleasas inactivadas y no inactivadas. Por ejemplo, podrían usarse cambios relativos en la fluorescencia de muestras de ADN que contienen SYBR green. Métodos adicionales son el ensayo de Kunitz (Kunitz, M; 1950, S. Gen Physiol, 33:363 y el documento WO 2011/010094) y el ensayo de Kunitz modificado ideado por Yamamoto (Yamamoto, M; 1971, Biochem BiophysActa, 228:95 y el documento WO 2011/010094). Métodos adecuados se describen en los ejemplos en el presente documento.

40 El beneficio de la inactivación "irreversible" es que la función catalítica de la endonucleasa no puede ser recuperada por cambios en la temperatura y, por tanto, la muestra tratada, que todavía puede contener la endonucleasa inactivada, puede usarse en procesamiento adicional o aplicaciones que implican el contacto con ácido nucleico de interés sin digestión de ese ácido nucleico. Así, la endonucleasa no recupera su actividad y sustancialmente no hay actividad residual; específicamente, queda menos del 5 %, preferentemente menos del 2 %, lo más preferentemente no queda actividad de endonucleasa detectable. Las enzimas de la invención son capaces de tal inactivación "irreversible" (condiciones que proporcionan tal inactivación se describen en el presente documento) y así la inactivación es preferentemente inactivación irreversible. La inactivación puede considerarse "irreversible" aunque depende de la presencia continuada de un aditivo de inactivación, por ejemplo un agente quelante de ion metálico o agente reductor.

55 La inactivación, que incluye inactivación resistente al cambio térmico ("irreversible"), puede requerir que la endonucleasa esté todavía en contacto con un aditivo de inactivación, como se ha definido anteriormente. A menos que sea de otro modo evidente del contexto, las actividades residuales descritas en el presente documento suponen la presencia continuada de un aditivo de inactivación, por ejemplo al menos 0,1, preferentemente al menos 0,2 mM de aditivo, por ejemplo, TCEP; agentes reductores más débiles pueden requerir concentraciones más altas, por ejemplo al menos 0,5 o 1 mM. Normalmente no se requiere más de 10 mM, preferentemente no más de 5 mM, o está presente.

60 Para ciertas aplicaciones, puede desearse tener una endonucleasa I que es inactiva incluso cuando no está presente, o esencialmente no está presente, aditivo de inactivación. Métodos para la eliminación del agente de inactivación se conocen en la técnica e incluyen diálisis y el uso de columnas de desalación o de intercambio de tampón. Las enzimas de la presente invención, si se tratan apropiadamente, pueden inactivarse hasta este grado. Condiciones adecuadas se describen en el Ejemplo 8. Las condiciones apropiadas dependerán de (i) la elección del aditivo de inactivación usado, (ii) la concentración de aditivo de inactivación añadido a la endonucleasa, (iii) la temperatura de inactivación a la que se calienta la endonucleasa (en presencia de aditivo de inactivación), (iv) el

tiempo que se incuba la endonucleasa a la temperatura de inactivación, (v) la temperatura a la que se almacena la endonucleasa después de enfriarse desde la temperatura de inactivación (en presencia del aditivo de inactivación) y (vi) el tiempo que se incuba la endonucleasa a la temperatura de almacenamiento.

5 El experto apreciaría que alteraciones a algunos de los parámetros que favorecen la inactivación, tales como un aumento en la concentración del aditivo de inactivación, pueden afectar los otros parámetros, tales como el tiempo que necesita almacenarse la endonucleasa a la temperatura de almacenamiento en presencia del aditivo de inactivación, con el fin de que se produzca la inactivación irreversible.

10 A modo de ejemplo, los inventores han encontrado que VsEndA_S44E puede volverse inactiva incluso en ausencia de agente de inactivación cuando se añade TCEP 10 mM, la endonucleasa se calienta a 50 °C durante 60 minutos, seguido de almacenamiento a temperatura ambiente durante dos días (entonces se elimina TCEP).

15 Alternativamente, si se añade TCEP 1 mM a la endonucleasa y la endonucleasa se calienta otra vez a 50 °C durante 60 minutos, pero la temperatura de almacenamiento aumentó a 37 °C, el tiempo de almacenamiento necesario para la inactivación irreversible disminuye a un día.

20 Es posible lograr tal inactivación sin ningún aumento inicial en la temperatura. Por ejemplo, para VsEndA_S44E la inactivación puede lograrse guardándola con TCEP 10 mM durante un día a 37 °C o durante cuatro días a temperatura ambiente. En estos casos, los inventores encontraron que incluso cuando TCEP se eliminó por diálisis, la enzima siguió inactiva.

25 La variación de las condiciones de inactivación descritas anteriormente muestra la flexibilidad que proporcionan las endonucleasas de la invención. Si se sabe que la muestra de interés no se afecta por un aditivo de inactivación, el experto puede elegir mantener el aditivo en la mezcla con el fin de reducir el tiempo o la temperatura de inactivación. Por otra parte, si el experto desea eliminar el aditivo de inactivación, puede incubar la muestra con el aditivo de inactivación durante un periodo de tiempo más largo o aplicar una temperatura de inactivación más alta.

30 La inactivación sustancial se produce preferentemente en el plazo de 15 minutos desde la incubación a una temperatura de o aproximadamente 30 °C, por ejemplo 28 a 32 °C en presencia de un aditivo de inactivación. La endonucleasa de la invención puede inactivarse sustancialmente a temperaturas más bajas o durante periodos de tiempo más cortos pero, según la invención, el calentar durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 30 °C en presencia de DTT es preferentemente suficiente para inactivar sustancialmente la enzima. Será rápidamente evidente para el experto que los ajustes a uno de estos dos parámetros pueden ser compensados por el ajuste del otro. Por ejemplo, el aumentar la temperatura de inactivación podría permitir reducir la duración de la incubación. En cambio, el aumentar la duración de la incubación podría permitir usar una temperatura de inactivación más baja. Por supuesto, como también es fácilmente evidente para el experto y se muestra en los ejemplos, cuando la endonucleasa de la invención se usa en los métodos de la invención, pueden usarse duraciones de la incubación más largas de 15 minutos y pueden usarse temperaturas de inactivación superiores a aproximadamente 30 °C.

40 Las temperaturas y los tiempos de inactivación para una endonucleasa deben evaluarse incubando la endonucleasa en una solución que imita a un tampón de PCR o de purificación de proteínas típico (por ejemplo, Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, MgCl₂ 5 mM). La endonucleasa debe estar presente a aproximadamente entre 0,1 U/μl y 100 U/μl, preferentemente entre 1 y 50 U/μl, por ejemplo 25-30 U/μl. Protocolos adecuados se describen en los ejemplos.

50 La mezcla de reacción está preferentemente a un pH al que la muestra o proteína de interés es estable. Un pH de entre 7,0 y 9,5, preferentemente aproximadamente 8,5, es particularmente adecuado con respecto a la actividad enzimática de la endonucleasa de la invención. Un pH de 8,5 también se adecuaría a un tampón de PCR o de purificación de proteínas típico.

55 Ventajosamente, la endonucleasa termolábil de la invención es completamente funcional en una mezcla de reacción de amplificación completa, y es compatible con reactantes y condiciones estándar de amplificación *in vitro*. La enzima debe también ser capaz de eliminar cantidades adecuadas de polinucleótidos contaminantes y/o remanentes de una mezcla de reacción, normalmente niveles de fg o pg, pero preferentemente hasta 1 ng. Preferentemente, la endonucleasa es capaz de degradar todos los remanentes en el plazo de 60 minutos a 37 °C, más preferentemente en el plazo de 30 minutos, lo más preferentemente en el plazo de 15 minutos.

60 También están incluidos dentro del alcance de la presente invención fragmentos enzimáticamente activos de las endonucleasas de la invención, apreciándose que la actividad catalítica puede ser retenida en variantes truncadas y otras variantes. Los ejemplos proporcionan un ensayo adecuado de actividad de endonucleasa.

65 La presente invención se ejemplifica por la mutación S44E preferida a VsEndA y más generalmente versiones modificadas de VsEndA son realizaciones preferidas de endonucleasas de la presente invención. La serina puede sustituirse por residuos distintos de Glu(E), en particular por homólogos no genéticamente codificados de Glu. El resto equivalente a serina 44 en otras secuencias de endonucleasa I puede estar sustituido. El resto equivalente a la

serina 44 en VsEndA se muestra para otras especies en los alineamientos de secuencias de las Figuras 3 y 4. Las siguientes tablas muestran el porcentaje de identidad de secuencia de diversas especies de *Vibrio* (Tabla 1) y una selección de otras bacterias (Tabla 2) con SEQ ID NO: 1 (VsEndA).

Secuencia 1	Secuencia 2	% de identidad
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. fischeri</i>	91
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. wodanis</i>	91
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. splendidus</i>	78
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	71
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. harveyi</i>	77
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. rotiferianus</i>	77
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. tubiashii</i>	73
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. sinaloensis</i>	74
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. vulnificus</i>	74
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. furnissii</i>	70
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. anguillarum</i>	71

Tabla 1

Secuencia 1	Secuencia 2	% de identidad
<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	71
<i>V. salmonicida</i>	<i>Oceanimonas sp.</i>	64
<i>V. salmonicida</i>	<i>Salmonella sp.</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Yokenella sp.</i>	66
<i>V. salmonicida</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Escherichia coli</i>	65
<i>V. salmonicida</i>	<i>Shigella sp.</i>	64
<i>V. salmonicida</i>	<i>Citrobacter sp.</i>	66
<i>V. salmonicida</i>	<i>Cronobacter sp.</i>	68
<i>V. salmonicida</i>	<i>Rahnella sp.</i>	63
<i>V. salmonicida</i>	<i>Erwinia sp.</i>	62
<i>V. salmonicida</i>	<i>Yersinia sp.</i>	63
<i>V. salmonicida</i>	<i>Serratia sp.</i>	62
<i>V. salmonicida</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	51

Tabla 2

10 Preferentemente, la endonucleasa de la invención es una endonucleasa de *Vibrio* o derivada de la misma. Otra endonucleasa modificada particularmente preferida según la presente invención es de *Vibrio cholerae* (VcEndA), por ejemplo en la que la serina adyacente al motivo de pentapéptido está sustituida por ácido glutámico.

15 Endonucleasas preferidas son aquellas que carecen del péptido señal del extremo N, es decir, se representan por SEQ ID NO: 4 o secuencias que son al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, 90 %, 95 % o el 98 % idénticas a SEQ ID NO: 4. Como la endonucleasa madura de la invención carece de péptido señal, a menos que sea de otro modo evidente del contexto, cualquier referencia en el presente documento a SEQ ID NO: 1 también puede considerarse una referencia a SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 es la primera secuencia citada en tanto las Fig. 3 como 4.

20 Endonucleasas preferidas de la invención tienen la secuencia de SEQ ID NO: 4, pero en la que el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC ha sido sustituido con un resto que tiene carga negativa. Las endonucleasas de SEQ ID NO: 4 en las que la serina en la posición 44 se ha sustituido con ácido glutámico son las más preferidas.

25 Endonucleasas desveladas adicionales tienen una secuencia de una endonucleasa I obtenible de una especie de *Vibrio*, pero en la que el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC ha sido sustituido con un resto que está tanto con carga negativa como es polar, preferentemente con carga negativa.

30 Como se trata en el presente documento, el aminoácido que sustituye el resto del extremo N del motivo de pentapéptido identificado no debe ser hidrófobo. Se preparó la enzima modificada VsEndA_S44A (alanina), pero el rendimiento fue solo de aproximadamente el 5 % del logrado con S44E y fue altamente inestable, perdiendo rápidamente toda la actividad catalítica.

35 El porcentaje de identidad de secuencia según la invención puede calcularse usando cualquiera de los algoritmos ampliamente disponibles (por ejemplo, usando el programa de alineamientos múltiples de secuencias Clustal W2

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>) usando parámetros por defecto (Penalización por apertura de hueco de ADN = 15,0; Penalización por extensión de hueco de ADN = 6,66; Matriz de ADN = Identidad; Penalización por apertura de hueco de proteína = 10,0; Penalización por extensión de hueco de proteína = 0,2; Matriz de proteína = Gonnet; Proteína/ADN ENDGAP = -1; Proteína/ADN GAPDIST = 4)

5 La posición exacta del resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC (es decir, el resto con carga negativa que forma parte del complejo con el ion cloruro) en las endonucleasas puede ser fácilmente identificada usando técnicas de alineamiento de secuencias estándar tales como Clustal W2 para producir alineamientos tales como los representados en las Figuras 3 y 4. Si una secuencia carece de un
10 motivo FYCGC completamente conservado, todavía será posible, usando estas técnicas de alineamiento de secuencias, identificar el resto equivalente a la serina 44 en SEQ ID NO 1.

15 Moléculas de ácidos nucleicos que codifican las endonucleasas de la invención y fragmentos de las mismas constituyen un aspecto adicional de la presente invención, prefiriéndose SEQ ID NO: 2 y secuencias al menos el 80 o el 90 % idénticas a la misma.

20 Se desvela el uso de la endonucleasa particular descrita anteriormente como agente descontaminante en métodos de amplificación de un ácido nucleico. Se desvela el uso de las endonucleasas particulares descritas anteriormente en los métodos de descontaminación descritos en el presente documento.

25 Un método para el aislamiento y la purificación de una endonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se ha descrito anteriormente representa un aspecto adicional de la presente invención. Así, en este aspecto la invención proporciona un método tal, comprendiendo dicho método expresar dicha endonucleasa o fragmento de la misma en una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, *Pichia pastoris*; *Escherichia coli*; *S. cerevisiae*, células de insecto infectadas con baculovirus), y posteriormente separar la endonucleasa de dichas células hospedadoras y/o los medios en los que dichas células se han cultivado. La expresión de dicha endonucleasa o fragmento de la misma puede lograrse incorporando en una célula hospedadora adecuada un vector de expresión que codifica dicha endonucleasa o fragmento de la misma.

30 Células hospedadoras que comprenden estos casetes de expresión y moléculas de ácidos nucleicos están englobadas por la invención.

35 La enzima endonucleasa puede separarse, o aislarse, de las células hospedadoras/medios de cultivo usando cualquiera de las técnicas de purificación para proteína conocidas en la técnica y ampliamente descritas en la bibliografía, o cualquier combinación de las mismas. Tales técnicas pueden incluir, por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, diálisis, diversas técnicas cromatográficas, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, electroforesis, centrifugación, etc.

40 Asimismo, también puede prepararse un extracto de células hospedadoras usando técnicas muy conocidas en la técnica, por ejemplo homogeneización, liofilización, etc., y a partir de este extracto pueden purificarse las endonucleasas de la invención.

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

50 Más particularmente, el extracto puede someterse a cromatografía de intercambio iónico y eluirse la proteína con un gradiente de NaCl. Las fracciones que contienen actividad de endonucleasa pueden dializarse y entonces aplicarse a una columna de afinidad antes de la elución final con NaCl.

55 Los rendimientos de las endonucleasas de la invención son excepcionalmente buenos. Se desvela un método de aumento del rendimiento de una endonucleasa I recombinantemente expresada que comprende sustituir el resto inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC con un resto que tiene carga negativa.

Endonucleasas desveladas que pueden modificarse de esta forma se describen en el presente documento y se ejemplifican, por ejemplo, en las Figuras 3 y 4. Métodos de expresión adecuados se han descrito anteriormente.

60 Se desvelan kits que comprenden al menos una endonucleasa según la invención. Los kits también pueden contener algunos o todos de los reactivos, tampones, enzimas, etc., necesarios para llevar a cabo reacciones de amplificación de ácido nucleico. Más particularmente, los kits pueden contener trifosfatos de nucleótido (incluyendo dATP que contiene un grupo tiol (dATP α S) para la amplificación por desplazamiento de hebra), cebadores de oligonucleótidos, preferentemente aquellos capaces de funcionar a aproximadamente 30 °C, ADN polimerasas, preferentemente una polimerasa termoestable tal como polimerasa *Taq* o polimerasa *Bst* (y versiones Hot start de las mismas) o, en el caso de LAR, una ADN ligasa (preferentemente una ADN ligasa termoestable tal como Ampligase® o la desvelada en el documento US 6280998 que se aísla de *Pyrococcus furiosus*) o una enzima de
65

restricción (preferentemente una enzima de restricción termoestable tal como BsoB1). La endonucleasa puede proporcionarse en un compartimento junto con una transcriptasa inversa, ADN polimerasa, polimerasa de desplazamiento de hebra o ligasa de LCR.

- 5 Los kits pueden contener materiales escritos como orientación sobre cómo realizar procedimientos relacionados con la invención. En particular, puede proporcionarse orientación sobre las condiciones de inactivación. Condiciones adecuadas se describen en cualquier parte en el presente documento pero, por medio de ejemplos generales adicionales, que también pueden proporcionarse con el kit o enzima, la Tabla 3 da condiciones de incubación sugeridas en presencia de aditivo de inactivación que son adecuadas para la inactivación de endonucleasa derivada de *Vibrio salmonicida* con la mutación Ser44Glu (VsEndA_S44E).

Temperatura (°C)	Concentración de ditioneitol (DTT) / tiempo	Concentración de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) / tiempo
25	20 mM/60 min	15 mM/60 min
40	10 mM/30 min	5 mM/30 min
50	1 mM/30 min o 10 mM/15 min	0,5 mM/30 min
60	1 mM/30 min	0,5 mM/30 min o 10 mM/15 min
65	1 mM/30 min	1 mM/30 min
70	1 mM/30 min	1 mM/30 min

Tabla 3

- 15 Se desvelan composiciones que comprenden una endonucleasa de la invención y uno o más de los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico y métodos, por ejemplo aquellos componentes descritos anteriormente. Normalmente, tales composiciones serán acuosas y estarán tamponadas con un tampón estándar tal como Tris, HEPES, etc.

- 20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende una endonucleasa I o fragmento activo como se define en el presente documento junto con una segunda endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma. Preferentemente, la segunda endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5 o una secuencia que es al menos el 80 % idéntica a la misma. La segunda enzima puede incorporar mutaciones, por ejemplo, a la secuencia de *Vibrio cholerae* nativa que hace que se inactíve más fácilmente. Tales combinaciones permiten que la composición en conjunto proporcione actividad de endonucleasa eficaz a un mayor intervalo de pH y/o concentración de sal y/o temperatura.

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

- 30 La Fig. 1 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos (incluyendo el péptido señal) de las endonucleasas derivadas de *Vibrio salmonicida* (VsEndA) y *V. cholerae* EndA (VcEndA), SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3, respectivamente.

- 35 La Fig. 2 muestra la secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de aminoácidos (incluyendo el péptido señal) de VsEndA con la mutación Ser44Glu (VsEndA_S44E), SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:6, respectivamente.

La Fig. 3 muestra los datos de alineamientos de secuencias de las secuencias de aminoácidos (excluyendo los péptidos señal) de la endonucleasa I no mutante derivada de bacterias de una variedad de géneros diferentes.

- 40 La Fig. 4 muestra los datos de alineamientos de secuencias de las secuencias de aminoácidos (excluyendo los péptidos señal) de la endonucleasa I no mutante derivada de diversas bacterias del género *Vibrio*.

- 45 La Fig. 5 muestra los niveles de expresión de VsEndA_S44E mutante (la endonucleasa VsEndA con la mutación Ser44Glu) y la enzima no mutante VsEndA (SEQ ID NO: 1) en células hospedadoras de *Pichia pastoris* que contienen los casetes de expresión pPIC9K-VsEndA_S44E y no mutantes, respectivamente.

La Fig. 6 muestra la tasa de inactivación de VsEndA y VsEndA_S44E a 40 °C (6a) y 50 °C (6b) ambos en presencia y ausencia de DTT 1 mM.

- 50 La Fig. 7 muestra la tasa de inactivación de VsEndA_S44E a 40 °C en presencia de 1 mM de uno de los siguientes aditivos de inactivación: DTT, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y 2-mercaptoetanol.

- 55 La Fig. 8 muestra las fotografías de geles de agarosa que muestran la actividad de la endonucleasa de VsEndA_S44E y VsEndA no mutante que han sido inactivadas en presencia de DTT a una concentración de tanto 1 mM, 10 mM como 20 mM durante 15, 30 o 60 minutos a una temperatura de tanto 50 °C (Fig. 8a), 40 °C (Fig. 8b), 30 °C (Fig. 8c) como 25 °C (Fig. 8d). Los resultados se compararon con tanto sin enzima (control negativo) como con 6 U de VsEndA no mutante (control positivo).

La Fig. 9 muestra las fotografías de geles de agarosa que muestran la actividad de la endonucleasa de VsEndA_S44E y VsEndA no mutante que han sido incubadas a 4 °C durante tanto 6 como 18 horas en presencia de tanto DTT (Fig. 9a) como TCEP (Fig. 9b) a una concentración de tanto 1 mM, 10 mM como 20 mM. Los resultados se compararon con tanto sin enzima (control negativo) como 6 U de VsEndA no mutante (control positivo).

La Fig. 10 muestra el grado de eliminación de ADN enriquecido de la ADN polimerasa AccuStart™ Taq comercialmente disponible (Fig. 9a) o polimerasa GoTaq® Hot Start (Fig. 9b) usando VsEndA_S44E mutante.

La Fig. 11 muestra el grado de eliminación de ADN enriquecido de la mezcla madre de qPCR Maxima comercialmente disponible usando VsEndA_S44E mutante.

La Fig. 12 muestra el grado de eliminación de ADN genómico bicatenario enriquecido de ADN polimerasa TEMPase comercialmente disponible usando VsEndA_S44E mutante en una solución que contenía tanto cloruro sódico 0,5 M (Fig. 11a) como cloruro sódico 1 M (Fig 11b).

La Fig. 13 muestra el grado de eliminación de ADN genómico bicatenario enriquecido de una solución de lisado celular de *E. coli* que contiene una proteína recombinantemente expresada usando VsEndA_S44E mutante en soluciones de cloruro sódico variables (0 M, 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M y 1,0 M).

La Fig. 14 muestra la actividad óptima de VsEndA_S44E mutante en soluciones con alta salinidad. La actividad se probó en un tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8,5, cloruro de magnesio 5 mM, con concentraciones variable de cloruro sódico y cloruro de potasio. La máxima actividad obtenida se estableció al 100 %.

La Fig. 15 muestra la actividad de VsEndA_S44E mutante a temperaturas variables. La actividad se probó en un tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8,5, que contenía cloruro de magnesio 5 mM y cloruro sódico 0,5 M.

La Fig. 16 muestra la capacidad de VsEndA_S44E mutante para degradar ADN a niveles variables de pH y concentraciones de cloruro sódico, en comparación con la nucleasa Benzonase comercialmente disponible (*Serratia marcescens*). Se llevaron a cabo reacciones a un pH de tanto 7,5, 8,0 como 8,5 y a una concentración de cloruro sódico de tanto 0,25 M o 0,5 M (Fig. 16a) como 0,75 M o 1,0 M (Fig. 16b). Las mezclas de reacción contuvieron 100 µl de tampón Tris-HCl con cloruro de magnesio 5 mM, 50 µg de ADN de timo de ternero y 300 U de tanto VsEndA_S44E como Benzonase. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron usando un tampón de carga que contenía EDTA y se ejecutaron en un 1 % de gel de agarosa.

La Fig. 17 muestra la capacidad de VsEndA_S44E mutante para degradar ADN en lisados de *E. coli* que contienen una proteína de unión a ADN. Se añadió VsEndA_S44E a lisados de *E. coli* a concentraciones variables de cloruro sódico y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. El control no contiene cloruro sódico.

y en la que

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la porción traducida de la secuencia de nucleótidos de ADNc de la endonucleasa I de *Vibrio salmonicida* no mutante, que incluye el péptido señal.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos de ADNc de endonucleasa I de *Vibrio salmonicida* mutante (VsEndA con la mutación TCC a GAG) que incluye la secuencia señal.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la porción traducida de la secuencia de nucleótidos de ADNc de la endonucleasa I de *Vibrio cholerae* no mutante, que incluye el péptido señal.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la porción traducida de la secuencia de nucleótidos de ADNc de la endonucleasa I de *Vibrio salmonicida* no mutante, sin el péptido señal.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la porción traducida de la secuencia de nucleótidos de ADNc de la endonucleasa I de *Vibrio cholerae* no mutante, sin el péptido señal.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de endonucleasa I de *Vibrio salmonicida* mutante (VsEndA, con un resto de serina sustituido por un glutámico y resto en la posición 44), que incluye la secuencia señal.

SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 20 son secuencias de aminoácidos de endonucleasa I, sin péptido señal, derivadas de bacterias de una variedad de géneros diferentes como se describe en la Tabla 2 y la Figura 3.

SEQ ID NO: 21 a SEQ ID NO: 30 son secuencias de aminoácidos de endonucleasa I, sin péptido señal, derivadas de diversas bacterias del género *Vibrio* como se describen en la Tabla 1 y la Figura 4.

Ejemplos

EJEMPLO 1 - Clonación y mutagénesis

5 El gen para la endonucleasa I de *Vibrio salmonicida* se amplificó por PCR a partir de un vector que contenía el gen y se clonó en el vector de expresión pPIC9K para *Pichia pastoris*. La secuencia señal nativa de la endonucleasa I de *V. salmonicida* se omitió en el vector de expresión, de forma que la secuencia de aminoácidos de la endonucleasa I de *V. salmonicida* que sigue al factor de apareamiento α codificado por el plásmido de expresión fue APPSSF.

10 La endonucleasa I de *V. salmonicida* (VsEndA) se mutó en el resto 44 de serina (Ser) a ácido glutámico (Glu) usando el kit de mutagénesis QuikChange™ de Agilent siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó el vector pPIC9K que contenía la secuencia de VsEndA truncada como molde. La secuencia correcta después de las reacciones de mutagénesis se verificó por secuenciación de ADN.

EJEMPLO 2 - Expresión y purificación

Se linealizó el vector pPIC9K-VsEndA_S44E usando SacI y se transformó en GS115 de *Pichia pastoris* como se describe en el manual para el kit de expresión de *Pichia pastoris* (Life Technologies). Se expresó S44E_endonucleasa I de *V. salmonicida* (VsEndA_S44E) en matraces con agitación esencialmente como se describe en el kit de expresión de *Pichia*. Se cultivó un precultivo de 50 ml de la cepa GS115 que contenía VsEndA_S44E en medio BMGY durante la noche a 30 °C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 250 ml de BMMY y la expresión se hizo durante 72 h a 20 °C. La adición de metanol a una concentración final de 0,5 % se hizo cada 24 h. Las células se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se usó como material de partida para la purificación.

Se purificó VsEndA_S44E usando cromatografía de intercambio catiónico. El sobrenadante (250 ml) se aplicó sobre una columna de SP-Sepharose FF (1,6/3) equilibrada en Tris/HCl 25 mM, pH 8,3, MgCl₂ 5 mM usando un flujo de 5 cm/min. La columna se lavó con 250 ml de NaCl 0,4 M en el tampón anterior. La elución de VsEndA_S44E se hizo usando Tris/HCl 25 mM, pH 8,3, MgCl₂ 5 mM + NaCl 1 M. Las fracciones que contenían actividad de VsEndA_S44E se reunieron y finalmente se concentraron.

EJEMPLO 3 - Medición de actividad de nucleasa

Puede ensayarse la actividad de nucleasa según el procedimiento de Kunitz (Kunitz, M., 1950, Crystalline Deoxyribonuclease, II, Digestion of Thymus Nucleic Acid. The Kinetics of Reaction. J. Gen. Physiol., 33, 363-377). Se ha usado una composición modificada de ésta para medir la actividad de nucleasa. Se añaden diez μ l de preparación de enzima a 50 μ g de ADN de timo de ternero en Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 5 mM, en un volumen final de 1 ml. La mezcla se incubó a 37 °C y el aumento en la absorción se mide a 260 nm. 1 U = 0,01 aumentos de DO₂₆₀ x min⁻¹.

Se llevó a cabo un estudio por el cual la actividad de VsEndA_S44E mutante se evaluó a diversa temperatura (sin agente reductor presente). La Figura 15 muestra que VsEndA_S44E tiene actividad óptima a aproximadamente 35 °C, pero funciona durante un amplio intervalo de temperatura (20 % de actividad a 10 °C y 50 °C).

EJEMPLO 4 - Comparación del nivel de expresión de VsEndA S44E frente a no mutante (VsEndA)

Se comparó un precultivo de 50 ml de la cepa GS115 que contenía el casete de expresión pPIC9K-VsEndA_S44E con una cepa que contenía el casete de expresión no mutante. Las dos cepas se cultivaron durante la noche a 30 °C en medio BGMY. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 250 ml de BMMY, y la expresión se hizo durante 72 h a 20 °C. La adición de metanol a una concentración final de 0,5 % se hizo cada 24 h y se midió la actividad de nucleasa como se ha descrito.

La Figura 5 muestra que VsEndA_S44E mutante da un nivel de expresión más alto en *Pichia pastoris* que la enzima VsEndA no mutante en términos de enzima expresada activa medida en U/ml en el sobrenadante celular. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" y VsEndA no mutante "wt" en las leyendas de las figuras.

Después de la purificación como se ha descrito anteriormente (en el Ejemplo 2), se determina que la actividad específica de VsEndA_S44E es aproximadamente el 20 % superior a la de VsEndA, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Endonucleasa	Actividad (U/ml)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
VsEndA_S44E	$1,69 \times 10^7$	0,69	$2,4 \times 10^7$
VsEndA	$1,12 \times 10^7$	0,56	$2,0 \times 10^7$

EJEMPLO 5 - Estabilidad a la temperatura de VsEndA_S44E en comparación con VsEndA

La semivida de la enzima no mutante (VsEndA) es aproximadamente 2 h a 70 °C y 5 h a 60 °C (datos no mostrados).

Se diluyeron enzimas, VsEndA_S44E y VsEndA, a una concentración de 200.000 U/ml en un tampón que contenía Tris/HCl 25 mM, pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, 0,01 % de Triton X-100 y ditioneitol (DTT) ± 1 mM. Se transfirió un volumen de 6 x 100 µl a diferentes tubos de Eppendorf. Las muestras se incubaron a 40 °C o 50 °C durante 0 a 40 minutos y a partir de aquí se dispusieron sobre hielo secuencialmente. La actividad restante se midió usando el ensayo de Kunitz modificado como se describe en el Ejemplo 3. A partir de los datos mostrados en la Figura 6, es evidente que para tanto VsEndA_S44E como VsEndA, se requiere la adición de DTT para la inactivación térmica. Tras la adición de DTT, las enzimas se inactivan a una tasa más rápida. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" y VsEndA no mutante "wt" en las leyendas de las figuras.

EJEMPLO 6 - Inactivación a la temperatura usando diferentes agentes reductores

Se probó la capacidad de VsEndA_S44E para inactivarse usando una variedad de aditivos de inactivación que comprendían DTT, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y 2-mercaptoetanol a una temperatura de 40 °C.

Cuando se comparan los datos mostrados en la Figura 7 con los de la Figura 6a, puede determinarse que todos los aditivos de inactivación facilitaron la inactivación. Se encontró que DTT y TCEP eran más eficaces como aditivos de inactivación en comparación con 2-mercaptoetanol. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" y VsEndA no mutante "wt" en las leyendas de las figuras.

EJEMPLO 7 - Experimentos de inactivación térmica

Para examinar la estabilidad a la temperatura y para determinar si es posible inactivar completamente VsEndA_S44E usando calor, se evaluó la integridad de un producto de PCR purificado en presencia de la enzima inactivada por calor. Esto proporcionó un ensayo más sensible en comparación con el ensayo de Kunitz modificado descrito en el Ejemplo 3, ya que puede probar si la inactivación es reversible tras la disminución en la temperatura, o irreversible.

Se transfirió enzima (VsEndA_S44E o no mutante, VsEndA, 130 U/µl) en tampón Tris/HCl 25 mM a pH 8,5, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 5 mM a tubos de Eppendorf en un volumen total de 50 µl. Se añadió ditioneitol (DTT) recién preparado a una concentración final de 1, 10 o 20 mM. Las muestras se inactivaron térmicamente durante 15, 30 o 60 minutos a diversas temperaturas. Los tubos se colocaron sobre hielo después de la etapa de inactivación.

Se realizó el ensayo para la determinación de actividad residual añadiendo 5 µl de enzima inactivada por calor a 500 ng de un producto de PCR de 500 pb en un tampón que consistía en Tris/HCl 25 mM a pH 8,5, MgCl₂ 5 mM y NaCl 0,5 M. Las muestras se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Donde se añadió DTT a la preparación de enzima para la inactivación, también estuvo presente en el ensayo para actividad residual.

Finalmente, para determinar cualquier degradación del producto de PCR, se analizaron muestras en 1 % de gel de agarosa. Se trataron un control negativo (sin enzima) y un control positivo (que contenía 6 U de enzima wt) de la misma forma que en las reacciones anteriores.

La Figura 8 resume los experimentos de inactivación térmica de VsEndA_S44E mutante en comparación con la enzima VsEndA no mutante a 50 °C, 40 °C, 30 °C y 25 °C. El control negativo muestra el producto de PCR intacto, mientras que el control positivo ilustra el efecto de aproximadamente el 1 % de actividad residual. A 50 °C, se encontró que la enzima VsEndA_S44E mutante estaba completamente inactivada después de 15 minutos en presencia de DTT 1 mM, mientras que la no mutante solo estaba parcialmente inactivada. A 40 °C, DTT 1 mM fue capaz de inactivar parcialmente VsEndA_S44E mutante después de 15 minutos, en comparación con 10 mM requerido para inactivar parcialmente la enzima VsEndA. A 25 °C, DTT a una concentración de 20 mM o menos no fue capaz de inactivar completamente la enzima VsEndA después de 60 minutos, mientras que 10 mM de DTT fue capaz de inactivar completamente VsEndA_S44E mutante después de 60 minutos, demostrando el efecto de la sustitución. La adición de al menos DTT 10 mM es necesaria para la inactivación completa de la enzima VsEndA_S44E mutante a 30 °C. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" y VsEndA no mutante "wt" en las leyendas de las figuras.

En otro experimento de inactivación térmica, se comparó VsEndA_S44E mutante con la enzima no mutante VsEndA a 4 °C, en presencia de tanto DTT como TCEP a una concentración de tanto 1 mM, 10 mM como 20 mM, usando los mismos controles descritos anteriormente. Como se muestra en la Figura 9, incluso a esta baja temperatura, la presencia de DTT 10 mM o TCEP fue capaz de inactivar completamente VsEndA_S44E mutante después de 6 horas. En comparación, incluso DTT 20 mM no fue capaz de inactivar la enzima no mutante VsEndA después de 18 horas de incubación. Se mostró que TCEP inactivaba completamente la enzima VsEndA a esta temperatura tanto después de 18 horas de incubación a una concentración de 10 mM o más como después de 6 horas de incubación a

una concentración de 20 mM.

EJEMPLO 8 - Experimentos de inactivación térmica - Actividad residual en ausencia de TCEP

5 En este ejemplo, los presentes inventores determinaron las condiciones donde la inactivación de VsEndA_S44E todavía se observa después de la eliminación del aditivo de inactivación.

10 Este ejemplo se llevó a cabo de un modo similar al Ejemplo 7, excepto que se estudió el aditivo de inactivación TCEP, y, después de haber tenido lugar la inactivación, se eliminó TCEP por diálisis usando tubos de diálisis de Pur-A-Lyzer (Sigma). El tampón se intercambiaba una vez durante una diálisis de dos días. La determinación de la actividad residual se realizó usando un 1 % de gel de agarosa como se describe en el Ejemplo 7.

15 Una selección de parámetros de inactivación óptimos determinados a partir de este estudio se presenta en la Tabla 5.

Parámetro				
(i) (mM)	(ii) (°C)	(iii) (min)	(iv) (°C)	(v) (días)
10	50	60	TA	2
10	N/A	N/A	37	1
10	N/A	N/A	TA	4
1	50	60	37	1

20 Tabla 5 - Parámetros requeridos para lograr la inactivación en VsEndA_S44E. Parámetro (i) - concentración del aditivo de inactivación TCEP añadido a la endonucleasa (mM), parámetro (ii) - la temperatura de inactivación a la que se calienta la endonucleasa (en presencia de aditivo de inactivación) (°C), parámetro (iii) - el tiempo que se incuba la endonucleasa a la temperatura de inactivación (minutos), parámetro (iv) - la temperatura a la que se almacena la endonucleasa después de enfriarse desde la temperatura de inactivación (en presencia del aditivo de inactivación) (°C o "TA" para temperatura ambiente) y parámetro (v) tiempo que se incuba la endonucleasa a la temperatura de almacenamiento (días). "N/A" para los parámetros (ii) y (iii) se aplica cuando VsEndA_S44E no se calienta a una temperatura de inactivación.

EJEMPLO 9 - Eliminación de ADN contaminante de una preparación de ADN polimerasa

30 Se probó la capacidad de VsEndA_S44E para eliminar ADN genómico bacteriano contaminante de ADN polimerasas comerciales en un tampón de polimerasa típico. Se trataron 0,14 U/μl de Accustart (Quanta Biosciences), Tempase (VWR) o GoTaq (Promega) con 28 U/μl de VsEndA_S44E durante 15 minutos a 37 °C en un tampón que consistía en Tris-HCl 10 mM, KCl 111 mM, MgCl₂ 5,6 mM. Después de la incubación a 37 °C durante 15 minutos, se añadió DTT a una concentración final de 10 mM y las muestras se incubaron a 40 °C durante 30 minutos con el fin de inactivar VsEndA_S44E mutante. Finalmente se añadieron cebadores, sondas y dNTP, y la concentración final de los componentes en la mezcla de reacción de polimerasa fue: 25 mU/μl de ADN polimerasa, 300 nM de cada cebador, sonda 200 nM, dATP 100 μM, dCTP, dGTP y dUTP 200 μM en un tampón compuesto de Tris-HCl 10 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM.

35 Se incluyeron los siguientes controles: a) muestras que contienen tampón en lugar de VsEndA_S44E, b) muestras que contienen tampón y ADN genómico de *E. coli*, c) muestras donde se añadió ADN genómico de *E. coli* antes de la inactivación de VsEndA_S44E, y d) muestras donde se añadió ADN genómico de *E. coli* después de la inactivación de VsEndA_S44E. Se realizó qPCR en reacciones de 20 μl en Stratagene Mx3500P (Agilent Technologies) y las condiciones de ciclado térmico fueron como se recomendó por los fabricantes de las ADN polimerasas.

45 VsEndA_S44E fue capaz de eliminar ADN genómico bacteriano contaminante de todas las polimerasas probadas. La Figura 10 ilustra el efecto del tratamiento con VsEndA_S44E de polimerasas Accustart y GoTaq. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" en las leyendas de las figuras. Se redujo el nivel de ADN contaminante bacteriano y se eliminó ADN genómico de *E. coli* enriquecido. No hay alteración o alteración mínima de la función de polimerasa después del tratamiento con VsEndA_S44E.

EJEMPLO 10 - Eliminación de ADN contaminante de una mezcla madre de PCR

55 Se ha mostrado que mezclas madres de PCR cuantitativa (qPCR) comerciales contienen cantidades traza de ADN genómico bacteriano contaminante. En este ejemplo se probó la capacidad de VsEndA_S44E para eliminar contaminantes de ADN genómico bacteriano de mezclas madres de qPCR comerciales. Se trató mezcla madre de qPCR Maxima (Fermentas) o Express qPCR Supermix Universal (Invitrogen) con 25 U/μl de VsEndA_S44E durante 15 minutos a 37 °C. Se inactivó S44E_End I añadiendo DTT 10 mM (1-4 ditiotreitól) e incubando a 40 °C durante 30 minutos. Para probar el efecto del tratamiento con VsEndA_S44E sobre la eliminación de ADN contaminante de la polimerasa, se analizó una muestra tratada con S44E_End I junto con los siguientes controles: a) muestras que

contienen tampón en lugar de VsEndA_S44E, b) muestras donde se añadió ADN genómico de *E. coli* antes del tampón, c) muestras donde se añadió ADN genómico de *E. coli* después del tampón, d) muestras donde se añadió ADN genómico de *E. coli* antes de la inactivación de VsEndA_S44E, y e) muestras donde se añadió ADN genómico de *E. coli* después de la inactivación de VsEndA_S44E. Finalmente, se añadieron cebadores y sonda a una concentración final de 300 nM y 200 nM, respectivamente. Los cebadores y la sonda se dirigieron al gen 16S ARNr de *E. coli* como se describe por Corless et al. (J Clin Microbiol. 2000, 38(5):1747-52). Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. La qPCR se realizó en reacciones de 20 µl en Stratagene Mx3500P (Agilent Technologies).

Como se ilustra en la Figura 11, VsEndA_S44E es capaz de disminuir el nivel de ADN bacteriano genómico contaminante en la mezcla madre de qPCR Maxima. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" en las leyendas de las figuras. Además, la adición de VsEndA_S44E a una mezcla madre enriquecida con ADN de *E. coli* produce el mismo valor de QC que la mezcla madre tratada con VsEndA_S44E (no enriquecida). S44E_End I también es capaz de eliminar algunos de los contaminantes de ADN bacteriano contenidos en la mezcla madre. La reacción de polimerasa no está influida por el tratamiento de VsEndA_S44E. Así, VsEndA_S44E es capaz de eliminar ADN contaminante, puede ser completamente inactivado y VsEndA_S44E inactivado no altera el rendimiento de la polimerasa. Se obtuvieron resultados similares con Express qPCR Supermix Universal (Life Technologies) (datos no mostrados).

EJEMPLO 11 - Eliminación de ADN genómico bacteriano de soluciones de polimerasa de alta salinidad

El tratamiento de VsEndA_S44E es particularmente útil en purificaciones de proteínas que deben estar libres de actividad de nucleasa ya que la inactivación de VsEndA_S44E puede llevarse a cabo fácilmente. Además, en la purificación de proteínas de unión a ADN, el uso de una nucleasa activa para sal es conveniente, ya que la sal puede añadirse a preparaciones de proteína para limitar las interacciones ADN-proteína. En este ejemplo los presentes inventores probaron la capacidad de VsEndA_S44E para eliminar contaminaciones de ADN de una ADN polimerasa en una solución de cloruro sódico 0,5 y 1,0 M.

Se trataron ADN polimerasa TEMPase Hot Start (VWR) en Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM y NaCl 0,5 M o 1,0 M con 25 U/µl de VsEndA_S44E durante 15 minutos a 37 °C. Los siguientes controles se analizaron junto con la muestra anterior: a) muestras que contienen tampón en lugar de VsEndA_S44E, b) muestras donde se añadieron 20 pg de ADN genómico de *E. coli* antes del tampón, y c) muestras donde se añadieron 20 pg de ADN genómico de *E. coli* antes de la inactivación de VsEndA_S44E. VsEndA_S44E se inactivó añadiendo DTT 10 mM e incubando a 40 °C durante 30 minutos. Después de la etapa de inactivación, el tampón de las muestras se cambió a un tampón de polimerasa usando columnas de desalación Zeba™ Spin con un corte de 7K (Termo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, se añadieron los cebadores y la sonda y los constituyentes del tampón de polimerasa fueron los siguientes: Tris-HCl 10 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, dATP 100 µM, dCTP, dGTP y dUTP 200 µM, 300 nM de cada cebador y 200 nM de la sonda. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 95 °C durante 15 min seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos. La qPCR se realizó en reacciones de 20 µl en Stratagene Mx3500P (Agilent Technologies).

La Figura 12 ilustra el tratamiento de VsEndA_S44E en soluciones de polimerasa que contienen cloruro sódico 0,5 M y 1,0 M. VsEndA_S44E mutante se ha abreviado "S44E" en las leyendas de las figuras. Estas figuras muestran que la capacidad de VsEndA_S44E mutante para eliminar el ADN de *E. coli* enriquecido en la solución de polimerasa no estuvo afectada por la alta salinidad.

En un estudio separado, se evaluó la actividad de VsEndA_S44E mutante durante un intervalo de concentraciones diferentes de cloruro sódico y cloruro de potasio. La Figura 14 ilustra que VsEndA_S44E tiene una actividad óptima a cloruro sódico aproximadamente 0,5 M, pero opera en un amplio intervalo de concentraciones de cloruro sódico y cloruro de potasio.

En otro estudio, se comparó la actividad enzimática de VsEndA_S44E mutante en la degradación de ADN de timo de ternero a un intervalo de concentraciones variables de cloruro sódico y niveles de pH con la actividad de la nucleasa Benzonase (*Serratia marcescens*) comercialmente disponible. La Figura 16 ilustra que VsEndA_S44E degrada ADN a un intervalo más amplio de niveles de pH y concentraciones de cloruro sódico en comparación con Benzonase.

En otro estudio, se evaluó la actividad enzimática de VsEndA_S44E mutante en degradar ADN de lisado celular de *E. coli* a un intervalo de concentraciones variables de cloruro sódico. La Figura 17 ilustra que VsEndA_S44E mutante fue activa a concentraciones de cloruro sódico de 0,25 M a 1,0 M.

EJEMPLO 12 - Uso de S44E_EndA para eliminar ADN de una preparación de purificación de proteínas

Como VsEndA_S44E podría ser útil en esquemas de purificación de proteínas, particularmente en la purificación de

proteínas de unión a ADN que deben estar libres de actividad de nucleasa y ADN contaminante, los presentes inventores probaron la capacidad de VsEndA_S44E para eliminar ADN genómico de un extracto de *E. coli* que contenía una proteína de unión a ADN recombinantemente expresada.

5 La proteína recombinantemente expresada en este ejemplo era uracil-ADN glucosilasa de bacalao (UNG de bacalao) que cataliza la eliminación de uracilo de ADN que contiene uracilo. Se recogieron células de *E. coli* que
 10 contenían UNG de bacalao, se lavaron y entonces se lisaron por sonicación en un tampón Tris/HCl (Tris/HCl 25 mM a pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, 1 % de glicerol) que contenía lisozima. El extracto de células se centrifugó y el
 15 sobrenadante se recogió. El pH del sobrenadante se ajustó a 8,5 antes de añadir las siguientes concentraciones de NaCl: 0 M, 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M o 1,0 M. También se añadió MgCl₂ a 10 mM antes del tratamiento con 50 U/μl de
 VsEndA_S44E durante 30 min a 37 °C. Entonces se inactivó VsEndA_S44E añadiendo DTT 10 mM e incubando a 40 °C durante 30 min. También se incluyeron controles no tratados. Se añadió sobrenadante tratado con
 VsEndA_S44E (1 μl) a una reacción de qPCR de 50 μl que contenía ADN polimerasa TEMPase Hot Start (VWR) con la misma composición de tampón de PCR y condiciones de ciclado térmico, como se ha descrito antes en el Ejemplo

20 Como se muestra en la Figura 13, VsEndA_S44E fue capaz de eliminar la mayoría del ADN genómico de *E. coli* (>99,5 %) en muestras que contenían NaCl 0,5 M o más, aunque una cantidad significativa de ADN todavía queda en el lisado. En muestras de salinidad relativamente baja (NaCl 0 M y 0,25), se encuentra que los valores de C_q son
 25 los mismos para tanto las muestras sin tratar como tratadas con VsEndA_S44E. Esto sugiere que el ADN dentro de la muestra está interaccionando con la proteína, haciéndola poco disponible para tanto la enzima VsEndA_S44E como la polimerasa. En comparación, a concentraciones de NaCl más altas (0,5 M, 0,75 M y 1,0 M) se observa una
 30 clara diferencia en los niveles de ADN entre las muestras sin tratar y las muestras que contienen VsEndA_S44E mutante, sugiriendo que NaCl hace que el ADN esté más disponible para tanto VsEndA_S44E como la polimerasa. Este ejemplo demuestra que VsEndA_S44E es ideal para la eliminación de ADN de extractos de células que
 35 contienen proteínas de unión a ADN recombinantemente expresadas. La adición de sales reduce las interacciones proteína-ADN haciendo que el ADN esté disponible para VsEndA_S44E activo para sal. Además, VsEndA_S44E puede ser fácilmente irreversiblemente inactivada, una característica que es importante ya que las preparaciones de
 40 proteínas de unión a ADN comúnmente necesitan estar libres de actividad de nucleasa.

EJEMPLO 13 - El efecto del aditivo de inactivación TCEP sobre la calidad de PCR

En este ejemplo, los presentes inventores muestran el efecto de TCEP sobre la polimerasa Tempase y el tampón
 35 Tempase Key sobre la eficiencia de PCR.

Se añadió TCEP de concentraciones variables a las tiras de PCR, antes de añadir el resto de los componentes de
 40 PCR. Se usó gADN de *E. coli* (100 fg) como molde para un conjunto de cebador/sonda 23S. Todas las muestras se realizaron por duplicado, y todas las reacciones de qPCR tuvieron un volumen total de 20 μl. Se probó la polimerasa
 Tempase (VWR) en tampón Tempase Key y en "tampón Arctic" (conc final: Tris-HCl 10 mM a pH 8,3, KCl 10 mM y
 MgCl₂ 5 mM), además de la mezcla madre Agilent Brilliant III (Agilent Technologies).

Los resultados de este estudio muestran que una concentración de TCEP de 2,5 mM o inferior no tiene efecto
 perceptible sobre la eficiencia de PCR (datos no mostrados).

EJEMPLO 14 - Estabilidad de la inactivación de VsEndA_S44E en las limpiezas de Taq polimerasa

La presencia de TCEP puede ser necesaria para mantener VsEndA_S44E inactiva después de haberse llevado a
 50 cabo los procedimientos de inactivación. Por este motivo, los presentes inventores evaluaron la capacidad a largo
 plazo de TCEP para mantener la inactivación de VsEndA_S44E.

Se mezcló un tampón que comprende 2 μl de tampón Tempase Key, 0,8 μl de dNTP/dUTP (2,5/5 mM), 0,2 μl de
 Tempase (5 U/μl), 1 μl de tampón de almacenamiento de VsEndA_S44E / VsEndA_S44E (10 U/μl) y 1 μl de agua en
 un volumen de 17,5 x y se incubó a 37 °C durante 25 minutos. Después de la etapa de descontaminación de ADN,
 55 VsEndA_S44E se inactivó añadiendo 1 μl de TCEP 50 mM por 1x reacción e incubando a 37 °C durante 25 minutos. Después de la inactivación, la mezcla se almacenó durante 14 días a 4 °C (a una concentración eficaz de TCEP 8,3
 mM). La mezcla tratada se dispersó a partir de aquí en tiras de qPCR y se añadieron cebadores/sonda 23S de *E. coli*
 60 y molde (200 fg de gADN de *E. coli* o sin molde) disueltos en 14 μl. El volumen total de cada mezcla de qPCR fue 20 μl. Esta dilución garantizó que la concentración de TCEP se redujera a 2,5 mM, que, a partir de los resultados
 del Ejemplo 13, se sabía que no afectaba la eficiencia de PCR. Las tiras se almacenaron a 4 °C durante 4 horas con
 el fin de detectar cualquier pérdida de molde producida por VsEndA_S44E reactivada antes de realizar la qPCR. Se
 realizó qPCR en un Stratagene Mx3500P (Agilent Technologies) y las condiciones de ciclado térmico fueron las
 siguientes: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de 95 °C, 60 °C durante 30
 segundos y 72 °C durante 30 segundos.

65 Los resultados muestran que no hay reactivación significativa de VsEndA_S44E durante un periodo de al menos 2

semanas a 4 °C cuando se guarda en presencia del aditivo de inactivación TCEP a una concentración de 8,3 mM (datos no mostrados).

EJEMPLO 15 - El rendimiento de una mezcla de VsEndA S44E y VcEndA (no mutante) en tampones con concentraciones de cloruro sódico y pH variables

VsEndA_S44E tiene un óptimo de pH de 8,5 y un óptimo de concentración de cloruro sódico de 425 mM. Un homólogo de la endonucleasa no mutante derivada de *Vibrio salmonicida* (VsEndA) obtenida de *Vibrio cholerae*, aquí denominada VcEndA, tiene un amplio intervalo de pH, con un óptimo de pH de 7,5 y un óptimo concentración de cloruro sódico de 175 mM. Los presentes inventores, por tanto, combinaron VsEndA_S44E y VcEndA con el fin de determinar si produciría un producto de nucleasa con un amplio intervalo de trabajo de pH y concentración de cloruro sódico, junto con características de inactivación favorables. Aquí, los presentes inventores probaron el rendimiento de esta composición de enzima en tampones Tris con pH variables y concentraciones de cloruro sódico contra el rendimiento de Benzonase, la principal nucleasa no específica en el mercado.

Se prepararon un total de veinte tampones Tris 25 mM que contenían MgCl₂ 5 mM con combinaciones de diferentes pH y concentraciones de cloruro sódico como se representa en la matriz mostrada en la Tabla 6.

	NaCl 0 M	NaCl 0,25 M	NaCl 0,5 M	NaCl 0,75 M	NaCl 1,0 M
pH 7	1	2	3	4	5
pH 7,5	6	7	8	9	10
pH 8,0	11	12	13	14	15
pH 8,5	16	17	18	19	20

Tabla 6

Se preparó la mezcla de VsEndA_S44E y VcEndA mezclando las enzimas 1:1 (peso/peso) y la actividad se midió en un tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8 que contenía cloruro sódico 250 mM. En 100 µl de tampón que contenía 50 µg de ADN de timo de ternero, se añadieron 300 U de enzima y las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron añadiendo un colorante de carga que contenía EDTA y las muestras se cargaron sobre un 1 % de gel de agarosa.

Los resultados no mostraron deterioro significativo de la actividad de la composición de VsEndA_S44E/VcEndA a un intervalo de concentración de cloruro sódico de entre 0 M y 1 M. En comparación, Benzonase mostró alguna pérdida en actividad a 0,25 M y por encima (datos no mostrados). Además, una composición que comprende VsEndA_S44E y VcEndA mostró inactivación completa después del almacenamiento con DTT o TCEP 20 mM a 4 °C durante 6 horas, mientras una composición que comprende VsEndA no mutante y VcEndA no mostró características de inactivación similares bajo estas condiciones (datos no mostrados).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biotec Pharmacon ASA

<120> Endonucleasas

<130> 59.67.111897/02

<150> GB1202768.6

<151> 17-02-2012

<150> GB1216029.7

<151> 07-09-2012

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> *Vibrio salmonicida*

<400> 1

ES 2 622 906 T3

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

Val Asn Val Met Ala Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys
 20 25 30

Glu Ala Val Lys Ile Tyr Leu Asp Tyr Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly
 35 40 45

Cys Asp Ile Thr Trp Lys Asn Lys Lys Lys Gly Ile Pro Glu Leu Glu
 50 55 60

Ser Cys Gly Tyr Gln Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile
 65 70 75 80

Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln
 85 90 95

Cys Trp Gln Lys Gly Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Lys Gln
 100 105 110

Phe Lys Ser Met Glu Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly
 115 120 125

Glu Val Asn Gly Asp Arg Ser Asn Phe Arg Phe Ser Gln Trp Asn Gly
 130 135 140

Ser Lys Gly Ala Phe Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys
 145 150 155 160

Gly Arg Val Ala Glu Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg
 165 170 175

Thr Tyr Leu Tyr Met Asn Asn Glu Tyr Lys Phe Asn Leu Ser Lys Ala
 180 185 190

Gln Arg Gln Leu Met Glu Ala Trp Asn Lys Gln Tyr Pro Val Ser Thr
 195 200 205

Trp Glu Cys Thr Arg Asp Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His
 210 215 220

Asn Gln Phe Val Tyr Lys Ala Cys Thr Lys
 225 230

<210> 2
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ADNc

ES 2 622 906 T3

<400> 2

```

atgaaattaa ttcgcttagt tatcagtctt attgctgtca gtttcaactgt taacgtaatg      60
gcagcacctc cttcttcttt ctcaaaagca aaaaaagaag ccgtcaaaat ctatcttgat      120
taccaaccg agttttattg tggctgtgac attacgtgga aaaataaaaa gaaagggatc      180
cctgaattag aaagctgctg ataccaagtc cgtaaacaag aaaaacgagc cagtcgtatt      240
gaatgggagc atgttgttcc agcatggcaa tttggtcac aacgtcaatg ttggcaaaaa      300
ggtgggcgta aaaattgcac tagaaacgac aagcaattca aatcaatgga agccgactta      360
cataatctag tgcctgcatg tggatgaagta aacggggaca gatccaactt ccgattctca      420
caatggaatg gaagcaaagg cgctttctat ggccaatgtg cttttaaagt cgacttcaaa      480
ggccgtggtg ccgagccacc agcacaatct cgtggtgcca ttgcccgaaac gtatctttat      540
atgaacaacg aatataaatt taacttatca aaagcacagc gacaacttat ggaagcatgg      600
aacaacagt atccagtatc aacttgggaa tgtactcgtg atgaacgtat agcaaaaatc      660
caaggcaatc ataatcaatt tgtttataaa gcatgcacta aataa                          705

```

5 <210> 3
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

10 <400> 3

ES 2 622 906 T3

Met Met Ile Phe Arg Phe Val Thr Thr Leu Ala Ala Ser Leu Pro Leu
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Ile Ser Phe Ser His Ala Lys Asn Glu Ala
20 25 30

Val Lys Ile Tyr Arg Asp His Pro Val Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Glu
35 40 45

Ile Arg Trp Gln Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ser Cys Gly
50 55 60

Tyr Gln Val Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu
65 70 75 80

His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Leu Gln Cys Trp Gln
85 90 95

Gln Gly Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Thr Ser Pro Glu Phe Asn Gln
100 105 110

Met Glu Ala Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn
115 120 125

Gly Asn Arg Ser Asn Phe Ser Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ile Asp Gly
130 135 140

Val Thr Tyr Gly Gln Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Glu Arg Thr
145 150 155 160

Ala Met Pro Pro Glu Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu
165 170 175

Tyr Met Ser Glu Gln Tyr Gly Leu Arg Leu Ser Lys Ala Gln Asn Gln
180 185 190

Leu Met Gln Ala Trp Asn Asn Gln Tyr Pro Val Ser Glu Trp Glu Cys
195 200 205

Val Arg Asp Gln Lys Ile Glu Lys Val Gln Gly Asn Ser Asn Arg Phe
210 215 220

Val Arg Glu Gln Cys Pro Asn
225 230

<210> 4
<211> 213

ES 2 622 906 T3

<212> PRT
 <213> *Vibrio salmonicida*

<400> 4

5

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Leu Asp Tyr Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Thr Trp
 20 25 30

Lys Asn Lys Lys Lys Gly Ile Pro Glu Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Gln
 35 40 45

Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val
 50 55 60

Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Lys Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Lys Gln Phe Lys Ser Met Glu
 85 90 95

Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp
 100 105 110

Arg Ser Asn Phe Arg Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ser Lys Gly Ala Phe
 115 120 125

Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys Gly Arg Val Ala Glu
 130 135 140

Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met
 145 150 155 160

Asn Asn Glu Tyr Lys Phe Asn Leu Ser Lys Ala Gln Arg Gln Leu Met
 165 170 175

Glu Ala Trp Asn Lys Gln Tyr Pro Val Ser Thr Trp Glu Cys Thr Arg
 180 185 190

Asp Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Gln Phe Val Tyr
 195 200 205

Lys Ala Cys Thr Lys
 210

<210> 5
 <211> 211

ES 2 622 906 T3

<212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

<400> 5

5

```

Ala Pro Ile Ser Phe Ser His Ala Lys Asn Glu Ala Val Lys Ile Tyr
1           5           10           15

Arg Asp His Pro Val Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Glu Ile Arg Trp Gln
          20           25           30

Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Gln Val Arg
          35           40           45

Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val Pro
          50           55           60

Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Leu Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly Arg
65           70           75           80

Lys Asn Cys Thr Arg Thr Ser Pro Glu Phe Asn Gln Met Glu Ala Asp
          85           90           95

Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asn Arg Ser
          100          105          110

Asn Phe Ser Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ile Asp Gly Val Thr Tyr Gly
          115          120          125

Gln Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Glu Arg Thr Ala Met Pro Pro
          130          135          140

Glu Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser Glu
145          150          155          160

Gln Tyr Gly Leu Arg Leu Ser Lys Ala Gln Asn Gln Leu Met Gln Ala
          165          170          175

Trp Asn Asn Gln Tyr Pro Val Ser Glu Trp Glu Cys Val Arg Asp Gln
          180          185          190

Lys Ile Glu Lys Val Gln Gly Asn Ser Asn Arg Phe Val Arg Glu Gln
          195          200          205

Cys Pro Asn
          210
    
```

<210> 6
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Péptido mutado de *Vibrio salmonicida*

10

<400> 6

ES 2 622 906 T3

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

Val Asn Val Met Ala Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys
 20 25 30

Glu Ala Val Lys Ile Tyr Leu Asp Tyr Pro Thr Glu Phe Tyr Cys Gly
 35 40 45

Cys Asp Ile Thr Trp Lys Asn Lys Lys Lys Gly Ile Pro Glu Leu Glu
 50 55 60

Ser Cys Gly Tyr Gln Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile
 65 70 75 80

Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln
 85 90 95

Cys Trp Gln Lys Gly Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Lys Gln
 100 105 110

Phe Lys Ser Met Glu Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly
 115 120 125

Glu Val Asn Gly Asp Arg Ser Asn Phe Arg Phe Ser Gln Trp Asn Gly
 130 135 140

Ser Lys Gly Ala Phe Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys
 145 150 155 160

Gly Arg Val Ala Glu Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg
 165 170 175

Thr Tyr Leu Tyr Met Asn Asn Glu Tyr Lys Phe Asn Leu Ser Lys Ala
 180 185 190

Gln Arg Gln Leu Met Glu Ala Trp Asn Lys Gln Tyr Pro Val Ser Thr
 195 200 205

Trp Glu Cys Thr Arg Asp Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His
 210 215 220

Asn Gln Phe Val Tyr Lys Ala Cys Thr Lys
 225 230

<210> 7
 <211> 218
 <212> PRT

ES 2 622 906 T3

<213> *Oceanimonas* sp.

<400> 7

```

Gly Glu Ala Met Ser Phe Arg Gln Ala Lys Lys Val Ala Pro Gly Ile
1          5          10          15

Tyr Asn Asp Asn Leu Lys Thr Phe Tyr Cys Gly Cys Asn Ile Asp Thr
20          25          30

Gln Gly Lys Lys Leu Val Pro Asp Leu Ala Gly Cys Gly Tyr Gln Val
35          40          45

Arg Lys Gln Gln Gln Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
50          55          60

Pro Ala Trp Glu Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly
65          70          75          80

Arg Lys Asn Cys Thr Arg Lys Asp Glu Leu Phe Arg Gln Met Glu Gly
85          90          95

Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
100         105         110

Ser Asn Tyr Arg Phe Ser Glu Trp Asn Gly Lys Pro Val Gln Tyr Gly
115        120        125

Gln Cys Gln Met Leu Val Asp Phe Lys Gly Arg Lys Val Gln Pro Pro
130        135        140

Glu Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Gln Gln
145        150        155        160

Gln Tyr Arg Leu Lys Ile Ala Arg Gln Gln Gln Lys Leu Phe Glu Ala
165        170        175

Trp Asn Arg Gln Tyr Pro Ala Ser Pro Trp Glu Cys Glu Arg Asp Asn
180        185        190

Arg Ile Ser Arg Ile Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Gln Glu Gln
195        200        205

          Cys Lys Asn Tyr Ala Tyr Thr Pro Asn Pro
          210        215

```

5

<210> 8

<211> 213

<212> PRT

10

<213> *Salmonella* sp.

ES 2 622 906 T3

<400> 8

Asp Gly Ile Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Ser Val Lys Val
 1 5 10 15

Asn Ala Asp Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Gln Ile Arg Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Val Val Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Lys Val
 35 40 45

Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Arg Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr Arg Lys Met Glu Ser Asp
 85 90 95

Met His Asn Leu Gln Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly
 100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
 115 120 125

Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Ala Lys Leu Ala Glu Pro Pro Ala
 130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Gln
 145 150 155 160

Tyr Gln Leu Lys Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Asn Val Trp
 165 170 175

Asp Lys Gln Tyr Pro Val Thr Ala Trp Glu Cys Glu Arg Asp Ala Arg
 180 185 190

Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Arg Ala Cys
 195 200 205

Gln Ala Arg Lys Ser
 210

5

<210> 9
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Enterobacter* sp.

ES 2 622 906 T3

<400> 9

Asp Gly Ile Asn Ser Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Gly Val Lys Val
1 5 10 15

Asn Ala Asp Val Pro Gly Asp Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asn Trp
20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Ile Val Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Lys Val
35 40 45

Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly
65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr Arg Gln Met Glu Ser Asp
85 90 95

Met His Asn Leu Gln Pro Ala Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly
100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
115 120 125

Cys Gly Met Lys Val Asp Phe Lys Glu Lys Val Ala Glu Pro Pro Ala
130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Arg
145 150 155 160

Tyr Asn Leu Asn Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Asn Ala Trp
165 170 175

Asn Lys Gln Tyr Pro Val Thr Glu Trp Glu Cys Gln Arg Asp Glu Arg
180 185 190

Ile Ala Arg Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Arg Ala Cys
195 200 205

Gln Ala Gln Lys Ser
210

5

<210> 10
<211> 213
<212> PRT
<213> *Yokenella* sp.

ES 2 622 906 T3

<400> 10

Glu Gly Ile Asn Ser Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Gly Val Lys Val
 1 5 10 15

Asn Ala Asp Val Ala Gly Asp Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asn Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Val Val Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Lys Val
 35 40 45

Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Gly Lys Asp Pro Val Tyr Arg Gln Met Glu Ser Asp
 85 90 95

Met His Asn Leu Gln Pro Ala Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly
 100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
 115 120 125

Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Gly Lys Val Ala Glu Pro Pro Ala
 130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Arg
 145 150 155 160

Tyr Gln Leu Ala Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Asn Ala Trp
 165 170 175

Asp Lys Gln Tyr Pro Val Ser Glu Trp Glu Cys Glu Arg Asp Glu Arg
 180 185 190

Ile Ala Lys Tyr Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Arg Ala Cys
 195 200 205

Gln Ala Gln Lys Ser
 210

5

<210> 11
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Klebsiella* sp.

10

ES 2 622 906 T3

<400> 11

Ala Gly Ile Asn Ser Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Gly Val Lys Val
 1 5 10 15

Asn Ala Asp Val Pro Gly Asp Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asp Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Val Ile Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Lys Val
 35 40 45

Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Val Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Glu Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Glu Tyr Arg Lys Met Glu Ser Asp
 85 90 95

Met His Asn Leu Gln Pro Ala Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly
 100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
 115 120 125

Cys Thr Met Lys Val Asp Phe Lys Asp Lys Ile Ala Glu Pro Pro Ala
 130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Arg
 145 150 155 160

Tyr Gln Leu Asn Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Thr Ala Trp
 165 170 175

Asn Lys Gln Tyr Pro Val Thr Ala Trp Glu Cys Glu Arg Asp Glu Arg
 180 185 190

Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Gln Ala Cys
 195 200 205

Gln Ala Gln Lys Ser
 210

5 <210> 12
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

ES 2 622 906 T3

<400> 12

Glu Gly Ile Asn Ser Phe Ser Gln Ala Lys Ala Val Ala Val Lys Ile
1 5 10 15

His Ala Asp Ala Pro Gly Thr Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asp Trp
20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Val Val Asp Leu Gln Ser Cys Gly Tyr Gln Val
35 40 45

Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Val Glu Trp Glu His Val Val
50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly
65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr Arg Lys Met Glu Ser Asp
85 90 95

Met His Asn Leu Gln Pro Ser Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly
100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
115 120 125

Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Glu Lys Val Ala Glu Pro Pro Ala
130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Gln
145 150 155 160

Tyr Asn Leu Thr Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Asn Ala Trp
165 170 175

Asn Lys Met Tyr Pro Val Thr Asp Trp Glu Cys Glu Arg Asp Glu Arg
180 185 190

Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Arg Ala Cys
195 200 205

Gln Ala Arg Lys Ser
210

5 <210> 13
<211> 213
<212> PRT
<213> *Shigella* sp.

10 <400> 13

ES 2 622 906 T3

Glu Gly Ile Asn Ser Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Ala Val Lys Val
 1 5 10 15

His Ala Asp Ala Pro Gly Thr Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asn Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Val Val Asp Leu Gln Ser Cys Gly Tyr Gln Val
 35 40 45

Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Val Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr Arg Lys Met Glu Ser Asp
 85 90 95

Met His Asn Leu Gln Pro Ser Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly
 100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
 115 120 125

Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Glu Lys Ala Ala Glu Pro Pro Ala
 130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Gln
 145 150 155 160

Tyr Asn Leu Thr Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Asn Ala Trp
 165 170 175

Asn Lys Met Tyr Pro Val Thr Asp Trp Glu Cys Glu Arg Asp Glu Arg
 180 185 190

Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Arg Ala Cys
 195 200 205

Gln Ala Arg Lys Ser
 210

- <210> 14
- <211> 213
- <212> PRT
- <213> *Citrobacter* sp.
- <400> 14

ES 2 622 906 T3

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

5 <210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Cronobacter* sp.
 10 <400> 15

ES 2 622 906 T3

Ala Ser Gly Ile His Ser Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Gly Val Lys
 1 5 10 15

Ile Asn Ala Asp Ala Pro Gly Asp Phe Tyr Cys Gly Cys Pro Ile Thr
 20 25 30

Trp Gln Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Lys Ala Cys Gly Tyr Gln
 35 40 45

Val Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val
 50 55 60

Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asn Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Lys Asn Cys Asp Lys Asp Pro Val Tyr Arg Glu Met Glu Thr
 85 90 95

Asp Leu His Asn Leu Gln Pro Ala Val Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
 100 105 110

Gly Asn Phe Leu Tyr Ser Gln Trp Arg Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly
 115 120 125

Gln Cys Glu Met Lys Val Asp Phe Lys Asn Lys Gln Ala Glu Pro Pro
 130 135 140

Ala Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp
 145 150 155 160

Lys Tyr Gln Leu Asn Leu Ser Arg Ala Gln Thr Gln Leu Phe Glu Ala
 165 170 175

Trp Asn Lys Leu Tyr Pro Val Thr Pro Trp Glu Cys Thr Arg Asp Glu
 180 185 190

Arg Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Gln Ala
 195 200 205

Cys Gln Gly Gln Asn Arg
 210

<210> 16
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> *Rahnella* sp.

5

<400> 16

ES 2 622 906 T3

Ile Gly Ala Leu Val Pro Leu Ser Ala Phe Ser Gln Ser Gly Asn Thr
 1 5 10 15

Ile Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Ala Val Lys Ile Asn Gln
 20 25 30

Gly Ala Pro Thr Phe Tyr Cys Gly Cys Asn Ile Arg Trp Gln Gly Lys
 35 40 45

Lys Gly Thr Pro Asp Leu Gln Ser Cys Gly Tyr Ala Val Arg Lys Ser
 50 55 60

Glu Leu Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp
 65 70 75 80

Gln Phe Gly His Gln Met Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly Arg Lys Asn
 85 90 95

Cys Ala Lys Asn Ala Asp Tyr Arg Gln Val Glu Thr Asp Leu His Asn
 100 105 110

Leu Glu Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Asn Asn Phe Met
 115 120 125

Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Arg Cys Glu Met
 130 135 140

Lys Ile Asp Phe Lys Ala Lys Ala Ala Glu Pro Pro Ala Arg Ala Arg
 145 150 155 160

Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Gln Tyr Lys Leu
 165 170 175

Asn Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Thr Ala Trp Asp Arg Gln
 180 185 190

Tyr Pro Val Thr Ala Trp Glu Cys Glu Arg Asp Asn Arg Ile Ala Arg
 195 200 205

Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Gln Ala Cys Ala Gln Arg
 210 215 220

Lys Ser
 225

<210> 17
 <211> 223

ES 2 622 906 T3

<212> PRT
 <213> *Erwinia* sp.

<400> 17

5

```

Phe Pro Pro Leu Phe Cys His Ala Leu Ser Gln Gly Asn Tyr Gln Gln
1          5          10          15

Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys Ala Trp Ala Ala Gln Ile His His Asp
20          25          30

Ala Pro Gly Thr Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asp Trp Gln Gly Lys
35          40          45

Lys Gly Val Pro Asp Leu Thr Ser Cys Gly Tyr Gln Val Arg Lys Asn
50          55          60

Ser Glu Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp
65          70          75          80

Ser Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly Arg Lys Asn
85          90          95

Cys Val Lys Asp Pro Val Tyr Arg Arg Met Glu Ser Asp Leu His Asn
100         105         110

Leu Gln Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Gly Asn Phe Met
115         120         125

Tyr Gly Gln Trp Ser Gly Gly Glu Gln Gln Tyr Gly Gln Cys Ala Met
130         135         140

Lys Val Asp Phe Lys Asn Lys Leu Ala Glu Pro Pro Ala Arg Ala Arg
145         150         155         160

Gly Ala Ile Ala Arg Thr Trp Phe Tyr Met Arg Asp Gln Tyr Gln Leu
165         170         175

Ser Met Ser Lys Gln Gln Thr Gln Leu Met Thr Ala Trp Ser Lys Leu
180         185         190

Tyr Pro Val Thr Pro Trp Glu Cys Glu Arg Asp Arg Arg Ile Ala Arg
195         200         205

Val Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Gln Ala Cys Gln Arg
210         215         220
    
```

<210> 18
 <211> 213

ES 2 622 906 T3

<212> PRT
 <213> *Yersinia* sp.

<400> 18

5

His Gly Ile Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys Ala Val Ala Ala Lys Ile
 1 5 10 15

His Gln Asp Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Gln Ile Asp Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Asn Ser Cys Gly Tyr Gln Pro
 35 40 45

Arg Lys Asn Ala Ala Arg Ala Ala Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr Arg Gln Ile Glu Thr Asp
 85 90 95

Leu His Asn Leu Gln Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Asn
 100 105 110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Gln
 115 120 125

Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Asn Lys Leu Ala Glu Pro Pro Val
 130 135 140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Gln
 145 150 155 160

Tyr Gln Leu Arg Leu Ser Ser Gln Gln Ser Lys Leu Phe Gly Val Trp
 165 170 175

Asp Arg Gln Tyr Pro Val Thr Asp Trp Glu Cys Leu Arg Asp Glu Arg
 180 185 190

Ile Ala Lys Thr Gln Gly Asn His Asn Pro Tyr Val Gln Arg Ala Cys
 195 200 205

Gln Arg Pro Lys Ser
 210

<210> 19
 <211> 213

ES 2 622 906 T3

<212> PRT
 <213> *Serratia* sp.

<400> 19

5

```

His Gly Ile Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Ile
1           5           10           15

Asn Gln Asp Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Lys Ile Asn Trp
          20           25           30

His Gly Lys Lys Gly Leu Pro Asp Leu Asn Ala Cys Gly Tyr Gln Pro
          35           40           45

Arg Lys Asn Ala Gln Arg Ala Gly Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
          50           55           60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Leu Gln Cys Trp Gln Asp Gly Gly
65           70           75           80

Arg Lys Asn Cys Asn Arg Asp Pro Val Tyr Arg Gln Ile Glu Thr Asp
          85           90           95

Leu His Asn Leu Gln Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Asn
          100          105          110

Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Arg Gly Gly Glu Gly Gln Tyr Gly Gln
          115          120          125

Cys Pro Met Lys Val Asp Phe Lys His Lys Gln Ala Glu Pro Pro Ala
          130          135          140

Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Arg Asp Arg
145          150          155          160

Tyr His Leu Arg Leu Ser Arg Gln Gln Thr Gln Leu Phe Glu Val Trp
          165          170          175

Asn Arg Gln Tyr Pro Val Ser Gln Trp Glu Cys Gln Arg Glu Ala Arg
          180          185          190

Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn Arg Asn Pro Tyr Ile Gln Gln Ala Cys
          195          200          205

Gln Arg Gln Lys Gly
          210
    
```

<210> 20
 <211> 213
 <212> PRT

10

ES 2 622 906 T3

<213> *Pseudomonas* sp.

<400> 20

Ala Gln Ala Gln Ala Pro Arg Thr Phe Ser Glu Ala Lys Lys Val Ala
 1 5 10 15

Trp Gly Leu Tyr Ala Pro Gln Ser Thr Glu Phe Tyr Cys Gly Cys Lys
 20 25 30

Tyr Thr Gly Lys Arg Val Asp Leu Ala Gly Cys Gly Tyr Val Pro Arg
 35 40 45

Lys Ser Ala Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Ile Val Pro
 50 55 60

Ala Trp Gln Ile Gly His Leu Arg Gln Cys Trp Gln Asn Gly Gly Arg
 65 70 75 80

Lys Asn Cys Thr Lys Ser Asp Pro Val Tyr Lys Arg Ala Glu Ala Asp
 85 90 95

Leu His Asn Leu Val Pro Ser Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Ser
 100 105 110

Asn Phe Ser Phe Gly Trp Val Pro Glu Gln Lys Gly Gln Tyr Gly Ser
 115 120 125

Cys Leu Thr Gln Val Asp Phe Lys Ala Lys Lys Val Met Pro Arg Pro
 130 135 140

Ser Ile Arg Gly Met Ile Ala Arg Thr Tyr Phe Tyr Met Ser Lys Gln
 145 150 155 160

Tyr Asn Leu Arg Leu Ser Arg Gln Asp Gln Gln Leu Tyr Gln Ala Trp
 165 170 175

Asp Lys Thr Tyr Pro Pro Gln Ile Trp Glu Arg Gln Arg Asn Gln Gln
 180 185 190

Val Ala Cys Val Met Gly Arg Gly Asn Glu Phe Val Gly Pro Val Asp
 195 200 205

Leu Lys Ala Cys Lys
 210

5

<210> 21
 <211> 213
 <212> PRT

ES 2 622 906 T3

<213> *Vibrio fischeri*

<400> 21

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Leu Asp His Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Thr Trp
 20 25 30

Lys Asp Lys Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Gln Ser Cys Gly Tyr Asn
 35 40 45

Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val
 50 55 60

Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Lys Asn Cys Thr Arg Lys Asp Lys Gln Phe Lys Leu Met Glu
 85 90 95

Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp
 100 105 110

Arg Ser Asn Phe Arg Phe Ser Gln Trp Asn Gly Asn Lys Gly Ala Tyr
 115 120 125

Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys Gly Arg Val Ala Glu
 130 135 140

Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met
 145 150 155 160

Asn Gln Glu Tyr Arg Phe Asn Leu Ser Lys Ser Gln Arg Gln Leu Met
 165 170 175

Asn Ala Trp Asp Lys Gln Tyr Pro Val Ser Glu Trp Glu Cys Glu Arg
 180 185 190

Asp Lys Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Gln Phe Val Tyr
 195 200 205

Lys Ala Cys Arg Lys
 210

5

<210> 22
 <211> 213
 <212> PRT

ES 2 622 906 T3

<213> *Vibrio wodanis*

<400> 22

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys Leu Ala Val Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Leu Asp His Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Thr Trp
 20 25 30

Lys Asp Lys Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Glu
 35 40 45

Val Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val
 50 55 60

Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asp Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Lys Asn Cys Thr Lys Asn Asp Lys Asn Phe Lys Met Met Glu
 85 90 95

Ala Asp Leu His Asn Leu Val Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp
 100 105 110

Arg Ser Asn Phe Arg Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ser Lys Gly Ala Asn
 115 120 125

Tyr Gly Gln Cys Ala Phe Lys Val Asp Phe Lys Gly Arg Val Ala Glu
 130 135 140

Pro Pro Ala Gln Ser Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Met Tyr Met
 145 150 155 160

Asn Lys Glu Tyr Arg Phe Asn Leu Ser Lys Ala Gln Arg Gln Leu Met
 165 170 175

Glu Ala Trp Asp Lys Gln Tyr Pro Val Ser Ala Trp Glu Cys Glu Arg
 180 185 190

Asp Gln Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Gln Phe Val Phe
 195 200 205

Lys Ala Cys Thr Lys
 210

5

<210> 23

<211> 212

<212> PRT

10

<213> *Vibrio splendidus*

<400> 23

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

5

<210> 24
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Vibrio harveyi*

ES 2 622 906 T3

<400> 24

```

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ala Lys Arg Glu Ala Val Lys Ile
1          5          10          15

Tyr Ala Asp His Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Lys Trp
          20          25          30

Gln Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asp Leu Ala Ser Cys Gly Tyr Gln Val
          35          40          45

Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
          50          55          60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asn Gly Gly
65          70          75          80

Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Asn Val Phe Lys Ser Met Glu Ala
          85          90          95

Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
          100          105          110

Ser Asn Tyr Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Met Asp Gly Val Ser Tyr
          115          120          125

Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Gln Arg Lys Val Met Pro
          130          135          140

Pro Asp Arg Ala Arg Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser
145          150          155          160

Lys Glu Tyr Gly Phe Lys Leu Ser Lys Gln Gln Thr Gln Leu Met Ser
          165          170          175

Ala Trp Asn Lys Ser Tyr Pro Val Asp Lys Trp Glu Cys Glu Arg Asp
          180          185          190

Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Gln Glu
          195          200          205

Ala Cys Arg Ala
          210

```

5

<210> 25
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Vibrio rotiferianus*

10

ES 2 622 906 T3

<400> 25

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ala Lys Arg Glu Ala Val Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Ala Asp His Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Lys Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Val Pro Asp Leu Ala Ser Cys Gly Tyr Gln Val
 35 40 45

Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asn Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Thr Arg Asn Asp Lys Val Phe Lys Ser Met Glu Ala
 85 90 95

Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
 100 105 110

Ser Asn Tyr Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Met Asp Gly Val Ser Tyr
 115 120 125

Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Gln Arg Lys Val Met Pro
 130 135 140

Pro Asp Arg Ala Arg Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser
 145 150 155 160

Lys Glu Tyr Gly Phe Lys Leu Ser Lys Gln Gln Thr Gln Leu Met Ser
 165 170 175

Ala Trp Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Lys Trp Glu Cys Glu Arg Asp
 180 185 190

Glu Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Gln Glu
 195 200 205

Ala Cys Arg Ala
 210

- 5 <210> 26
- <211> 213
- <212> PRT
- <213> *Vibrio tubiashii*

ES 2 622 906 T3

<400> 26

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Ala Asp His Pro Thr Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asn Ile Ser Trp
 20 25 30

Gln Gly Arg Lys Gly Ile Pro Asp Leu Glu Ser Cys Gly Tyr Gln Val
 35 40 45

Arg Lys Gln Gln Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asn Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Thr Lys Asn Asp Lys Ala Phe Arg Met Met Glu Ala
 85 90 95

Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
 100 105 110

Ser Asn Tyr Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Ile Asp Gly Val Ser Tyr
 115 120 125

Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys His Arg Lys Val Met Pro
 130 135 140

Pro Asp Arg Ala Lys Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Tyr Gly Phe Arg Leu Ser Lys Gln Gln Thr Gln Leu Met Asn
 165 170 175

Ala Trp Asn Lys Gln Phe Pro Val Asp His Trp Glu Cys Glu Arg Glu
 180 185 190

Gln Arg Ile Phe Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val His Gln
 195 200 205

Ala Cys Gln Ala Leu
 210

5 <210> 27
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> *Vibrio sinaloensis*

ES 2 622 906 T3

<400> 27

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Lys Lys Glu Ala Ile Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Ala Asp His Pro Ser Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Thr Trp
 20 25 30

Gln Gly Arg Lys Gly Thr Pro Asp Leu Asn Ser Cys Gly Tyr Gln Val
 35 40 45

Arg Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Asn Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ser Lys Asn Asp Asn Val Phe Arg Ser Met Glu Ala
 85 90 95

Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
 100 105 110

Ser Asn Tyr Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Val Asp Gly Val Ser Tyr
 115 120 125

Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Gln Arg Lys Val Met Pro
 130 135 140

Pro Asp Arg Ala Lys Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser
 145 150 155 160

Lys Glu Tyr Gly Phe Lys Leu Ser Lys Gln Gln Thr Gln Leu Met Thr
 165 170 175

Ala Trp Asn Lys Gln Phe Pro Val Asp Glu Trp Glu Cys Glu Arg Asp
 180 185 190

Lys Arg Ile Phe Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro
 195 200

5 <210> 28
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Vibrio vulnificus*

10 <400> 28

ES 2 622 906 T3

Ala Pro Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ala Lys Gln Gln Ala Val Lys Ile
1 5 10 15

Tyr Gln Asp His Pro Ile Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Glu Trp
20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Ile Pro Asn Leu Glu Thr Cys Gly Tyr Gln Val
35 40 45

Arg Lys Gln Gln Thr Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Lys Gly Gly
65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Ser Lys Asn Asp Gln Gln Phe Arg Leu Met Glu Ala
85 90 95

Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
100 105 110

Ser Asn Phe Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Met Asp Gly Val Ser Tyr
115 120 125

Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asn Phe Lys Gln Arg Lys Val Met Pro
130 135 140

Pro Asp Arg Ala Arg Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser
145 150 155 160

Gln Glu Tyr Gly Phe Gln Leu Ser Lys Gln Gln Gln Gln Leu Met Gln
165 170 175

Ala Trp Asn Lys Ser Tyr Pro Val Asp Glu Trp Glu Cys Thr Arg Asp
180 185 190

Asp Arg Ile Ala Lys Ile Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Gln Gln
195 200 205

Ser Cys Thr Val Arg
210

<210> 29
<211> 211
<212> PRT
<213> *Vibrio furnissii*

5

<400> 29

ES 2 622 906 T3

Ala Pro Ala Ser Phe Ser Gln Ala Lys Arg Glu Ala Val Lys Ile Tyr
1 5 10 15

Gln Asp His Pro Val Thr Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Gln Trp Gln
20 25 30

Gly Lys Lys Gly Thr Pro Asp Leu Lys Gly Cys Gly Tyr Gln Val Arg
35 40 45

Lys Gln Glu Lys Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val Pro
50 55 60

Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Leu Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly Arg
65 70 75 80

Lys Gln Cys Ser Arg His Asp Thr Ala Phe Lys Arg Met Glu Ala Asp
85 90 95

Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg Ser
100 105 110

Asn Leu Asn Phe Ser Gln Trp His Gly Ile Asp Gly Ala Thr Tyr Gly
115 120 125

Gln Cys Glu Ile Gln Val Asn Phe Gln Gln Arg Lys Val Met Pro Pro
130 135 140

Glu Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser Gln
145 150 155 160

Glu Tyr Gly Phe Arg Leu Ser Lys Ser Gln Thr Gln Leu Met Gln Val
165 170 175

Trp Asn Arg Gln Tyr Pro Val Asp Ser Trp Glu Cys Glu Arg Asp Gln
180 185 190

Arg Ile Phe Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Arg Gln Gln
195 200 205

Cys Ser Ser
210

5

<210> 30
<211> 212
<212> PRT
<213> *Vibrio anguillarum*

<400> 30

ES 2 622 906 T3

Ala Pro Pro Ala Ser Phe Ser Gln Ala Lys Lys Glu Ala Leu Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr His Asp His Pro Val Ser Phe Tyr Cys Gly Cys Asp Ile Ala Trp
 20 25 30

Gln Gly Lys Lys Gly Thr Pro Asp Leu Gln Ala Cys Gly Tyr Gln Val
 35 40 45

Arg Lys Gln Gln Thr Arg Ala Ser Arg Ile Glu Trp Glu His Val Val
 50 55 60

Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln Cys Trp Gln Gln Gly Gly
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Cys Thr Lys Asn Asp Thr Ile Phe Arg Ser Met Glu Ala
 85 90 95

Asp Leu His Asn Leu Thr Pro Ala Ile Gly Glu Val Asn Gly Asp Arg
 100 105 110

Ser Asn Tyr Asn Phe Ser Gln Trp Asn Gly Val Glu Gly Glu Ser Tyr
 115 120 125

Gly Arg Cys Glu Met Gln Val Asp Phe Lys Gln Arg Lys Val Met Pro
 130 135 140

Pro Asp Arg Ala Arg Gly Ser Ile Ala Arg Thr Tyr Leu Tyr Met Ser
 145 150 155 160

Gln Asn Tyr Gly Phe Gln Leu Ser Lys Ser Gln Thr Gln Leu Met Gln
 165 170 175

Ala Trp Asn Arg Gln Tyr Pro Ala Asp Glu Trp Glu Cys Lys Arg Asp
 180 185 190

Gln Arg Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro Phe Val Gln Gln
 195 200 205

Gln Cys Arg Ser
 210

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma en la que dicha endonucleasa I tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 o una secuencia que es al menos el 70 % idéntica a la misma y en la que el resto de aminoácido que está inmediatamente en el extremo N del motivo de pentapéptido FYCGC ha sido sustituido con un resto que tiene carga negativa.
- 10 2. La endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma de la reivindicación 1, en la que dicho resto con carga negativa está seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, ácido 4-fluoro-DL-glutámico, ácido γ -carboxi-DL-glutámico y ácido D-2-aminoadípico.
- 15 3. La endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma de la reivindicación 2, en la que dicho resto con carga negativa es ácido glutámico.
- 20 4. La endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que deriva de *Vibrio salmonicida*.
- 25 5. La endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se inactiva sustancialmente cuando se incuba durante 30 minutos a 50 °C en presencia de TCEP 0,5 mM y la actividad residual se evalúa en presencia de TCEP 0,5 mM.
- 30 6. La endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que, a una concentración de cloruro sódico 0,5 M, tiene una actividad catalítica que es no inferior al 60 % de la actividad catalítica presentada por dicha endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo a su concentración de sal óptima.
- 35 7. Un método de eliminación de polinucleótidos contaminantes de una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con una endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que la muestra se pone en contacto con la endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma en condiciones que permiten la digestión de cualquier polinucleótido en ella y entonces la muestra y la mezcla de endonucleasa se ponen en contacto con un aditivo de inactivación a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar dicha endonucleasa.
- 45 9. El método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicha muestra:
- (i) es una preparación que contiene una proteína recombinantemente producida de interés, preferentemente dicha proteína es una enzima;
 - (ii) contiene una proteína analito de interés, preferentemente en la que la muestra deriva de un lisado celular, muestra de tejido o líquido corporal;
 - (iii) comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo;
 - (iv) comprende una proteína de unión a ADN o una proteína que se asocia con ácidos nucleicos en solución; o
 - (v) es una solución de reactivo que puede usarse en una técnica de análisis de polinucleótidos, preferentemente PCR o secuenciación de ADN/ARN.
- 50 10. El método de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el aditivo de inactivación es un agente quelante de ion metálico o un agente reductor de enlaces disulfuro.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en el que el agente está seleccionado del grupo que consiste en ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y N-etilmaleimida.
- 60 12. Una molécula de ácido nucleico que codifica la endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o que codifica una proteína que comprende dicha endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma.
- 65 13. Un método para el aislamiento y la purificación de la endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho método expresar dicha endonucleasa o fragmento de la misma en una célula hospedadora adecuada, y posteriormente separar la endonucleasa de dichas células hospedadoras y/o los medios en los que se han cultivado dichas células.
14. Una composición que comprende la endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una segunda endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma.

15. La composición de la reivindicación 14, en la que la segunda endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5 o una secuencia que es al menos el 80 % idéntica a la misma, preferentemente en la que la segunda endonucleasa I o fragmento enzimáticamente activo de la misma es de *Vibrio cholerae*.

5

Figura 1

```

VsEndA      MKLIRLVISLIAVSFTVNVMAAPPSSFSKAKKEAVKIYLDYPTSFYCGCDITWKNKKKGI 60
VcEndA      MMIFRFVTT-LAASLPLLTF AAP- ISF SHAKNEAVKIYRDHPVSFYCGCEIRWQGKK-GI 57
            *   * *   * *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VsEndA      PELESCGYQVRKQEKRASRIEWEHVPAWQFGHQRCWQKGGKNCNTRNDKQFKSMEADL 120
VcEndA      PDLESCGYQVRKNENRASRIEWEHVPAWQFGHQLQCWQQGGRKNCTRISPEFNQMEADL 117
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VsEndA      HNLVPAIGEVNGDRSNFRFSQWNGSKGAFYGCQAFKVDKGRVAEPPAQSRGAIARTYLY 180
VcEndA      HNLTPAIGEVNGNRSNFSFSQWNGIDGVITYGQCEMQVNFKERTAMPPERARGAIARTYLY 177
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VsEndA      MNNEYKFNLSKAQRQLMEAWNKPYPVSTWECTRDERIAKIQGNHNQFVYKACTK 234
VcEndA      MSEQYGLRLSKAQNQLMQAWNNQYPVSEWECVRDQKIEKVQGNSNRFVREQC PN 231
            *   *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

ES 2 622 906 T3

Figura 2

1	ATG	AAA	TTA	ATT	CGC	TTA	GTT	ATC	AGT	CTT	ATT	GCT	GTC	AGT	TTC	45
1	M	K	L	I	R	L	V	I	S	L	I	A	V	S	F	15
46	ACT	GTT	AAC	GTA	ATG	GCA	GCA	CCT	CCT	TCT	TCT	TTC	TCA	AAA	GCA	90
16	T	V	N	V	M	A	A	P	P	S	S	F	S	K	A	30
91	AAA	AAA	GAA	GCC	GTC	AAA	ATC	TAT	CTT	GAT	TAC	CCA	ACC	GAG	TTT	135
31	K	K	E	A	V	K	I	Y	L	D	Y	P	T	E	F	45
136	TAT	TGT	GGC	TGT	GAC	ATT	ACG	TGG	AAA	AAT	AAA	AAG	AAA	GGG	ATC	180
46	Y	C	G	C	D	I	T	W	K	N	K	K	K	G	I	60
181	CCT	GAA	TTA	GAA	AGC	TGC	GGA	TAC	CAA	GTC	CGT	AAA	CAA	GAA	AAA	225
61	P	E	L	E	S	C	G	Y	Q	V	R	K	Q	E	K	75
226	CGA	GCC	AGT	CGT	ATT	GAA	TGG	GAG	CAT	GTT	GTT	CCA	GCA	TGG	CAA	270
76	R	A	S	R	I	E	W	E	H	V	V	P	A	W	Q	90
271	TTT	GGT	CAT	CAA	CGT	CAA	TGT	TGG	CAA	AAA	GGT	GGG	CGT	AAA	AAT	315
91	F	G	H	Q	R	Q	C	W	Q	K	G	G	R	K	N	105
316	TGC	ACT	AGA	AAC	GAC	AAG	CAA	TTC	AAA	TCA	ATG	GAA	GCC	GAC	TTA	360
106	C	T	R	N	D	K	Q	F	K	S	M	E	A	D	L	120
361	CAT	AAT	CTA	GTG	CCT	GCG	ATT	GGT	GAA	GTA	AAC	GGG	GAC	AGA	TCC	405
121	H	N	L	V	P	A	I	G	E	V	N	G	D	R	S	135
406	AAC	TTC	CGA	TTC	TCA	CAA	TGG	AAT	GGA	AGC	AAA	GGC	GCT	TTC	TAT	450
136	N	F	R	F	S	Q	W	N	G	S	K	G	A	F	Y	150
451	GGC	CAA	TGT	GCT	TTT	AAA	GTC	GAC	TTC	AAA	GGC	CGT	GTT	GCC	GAG	495
151	G	Q	C	A	F	K	V	D	F	K	G	R	V	A	E	165
496	CCA	CCA	GCA	CAA	TCT	CGT	GGT	GCC	ATT	GCC	CGA	ACG	TAT	CTT	TAT	540
166	P	P	A	Q	S	R	G	A	I	A	R	T	Y	L	Y	180
541	ATG	AAC	AAC	GAA	TAT	AAA	TTT	AAC	TTA	TCA	AAA	GCA	CAG	CGA	CAA	585
181	M	N	N	E	Y	K	F	N	L	S	K	A	Q	R	Q	195
586	CTT	ATG	GAA	GCA	TGG	AAC	AAA	CAG	TAT	CCA	GTA	TCA	ACT	TGG	GAA	630
196	L	M	E	A	W	N	K	Q	Y	P	V	S	T	W	E	210
631	TGT	ACT	CGT	GAT	GAA	CGT	ATA	GCA	AAA	ATC	CAA	GGC	AAT	CAT	AAT	675
211	C	T	R	D	E	R	I	A	K	I	Q	G	N	H	N	225
676	CAA	TTT	GTT	TAT	AAA	GCA	TGC	ACT	AAA	TAA					705	
226	Q	F	V	Y	K	A	C	T	K	*						

Figura 3

		↓	
<i>V.salmonicida</i>	-----AP--PSSFSKAKKEAVKIYLDYPT-----	S	FYCGCDITWKNKKKGIP 40
<i>V.cholerae</i>	-----A--PISFSHAKNEAVKIYRDHPV-----	S	FYCGCEIRWQGKK-GIP 38
<i>Oceanimonas sp.</i>	-----GE--AMSFQAKKVAPGIYNDNLK-----	T	FYCGCNIDTQGGK-LVP 39
<i>Salmonella sp.</i>	-----DG--INNFSQAKAASVKVNADAPG-----	S	FYCGCQIRWQGKK-GVV 39
<i>Enterobacter sp.</i>	-----DG--INSFSQAKAAGVKVNADVPG-----	D	FYCGCKINWQGKK-GIV 39
<i>Yokenella sp.</i>	-----EG--INSFSQAKAAGVKVNADVAG-----	D	FYCGCKINWQGKK-GVV 39
<i>Klebsiella sp.</i>	-----AG--INSFSQAKAAGVKVNADVPG-----	D	FYCGCKIDWQGKK-GVI 39
<i>E.coli</i>	-----EG--INSFSQAKAVAVKIHADAPG-----	T	FYCGCKIDWQGKK-GVV 39
<i>Shigella sp.</i>	-----EG--INSFSQAKAAAVKVHADAPG-----	T	FYCGCKINWQGKK-GVV 39
<i>Citrobacter sp.</i>	-----EG--INSFSQAKAAGVKVNADAPG-----	D	FYCGCKINWQGKK-GVV 39
<i>Cronobacter sp.</i>	-----ASG--IHSFSQAKAAGVKINADAPG-----	D	FYCGCPITWQGKK-GIP 40
<i>Rahnella sp.</i>	IGALVPLSAFSSQSGNTINNFSQAKAAAVKINQGAP-----	T	FYCGCNIRWQGKK-GTP 52
<i>Erwinia sp.</i>	-FPPLFCHALSQGNVQNNFSQAKAWAAQIHHADAPG-----	T	FYCGCKIDWQGKK-GVP 52
<i>Yersinia sp.</i>	-----HG--INNFSQAKAVAAKIHQDAPG-----	S	FYCGCQIDWQGKK-GIP 39
<i>Serratia sp.</i>	-----HG--INNFSQAKAAAAKINQDAPG-----	S	FYCGCKINWHGKK-GLP 39
<i>Pseudomonas sp.</i>	-----AQAQAPRTFSEAKKVAWGLYAPQST-----	E	FYCGCKY--TGKR---V 38
	* **	*****	*
<i>V.salmonicida</i>	ELESCGYQVRKQEKRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQKGGGRKNCTRNDKQFKSMEADLH		100
<i>V.cholerae sp.</i>	DLESCGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAAWQFGHQLQCWQGGGRKNCTRISPEFNQMEADLH		98
<i>Oceanimonas sp.</i>	DLACGYQVRKQQQRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQGGGRKNCTRKDELFRQMEGDLH		99
<i>Salmonella sp.</i>	DLESCGYKVRKNENRARRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNCAK-DPVYRKMESDMH		98
<i>Enterobacter sp.</i>	DLESCGYKVRKNENRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNCAK-DPVYRKMESDMH		98
<i>Yokenella sp.</i>	DLESCGYKVRKNENRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNCGK-DPVYRKMESDMH		98
<i>Klebsiella sp.</i>	DLESCGYKVRKNENRASRVWEHVVPAAWQFGHQRCWQEGGRKNCAK-DPEYRKMESDMH		98
<i>E.coli</i>	DLQSCGYQVRKNENRASRVWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNCAK-DPVYRKMESDMH		98
<i>Shigella sp.</i>	DLQSCGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNCAK-DPVYRKMESDMH		98
<i>Citrobacter sp.</i>	DLESCGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNCAK-DPVYRKMESDMH		98
<i>Cronobacter sp.</i>	DLKACGYQVRKNENRASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQNGGRKNCDK-DPVYREMETDLH		99
<i>Rahnella sp.</i>	DLQSCGYAVRKNSELRASRIEWEHVVPAAWQFGHQMQCWQDGGGRKNCAK-NADYRQVETDLH		111
<i>Erwinia sp.</i>	DLTSCGYQVRKNSEERASRIEWEHVVPAAWQFGHQRCWQDGGGRKNVCV-DPVYRRMESDLH		111
<i>Yersinia sp.</i>	DLNSCGYQPRKNAARAARIWEHVVPAAWQFGHQRCWQGGGRKNCAK-DPVYRQIETDLH		98
<i>Serratia sp.</i>	DLNACGYQPRKNAQRAGRIEWEHVVPAAWQFGHQLQCWQDGGGRKNENR-DPVYRQIETDLH		98
<i>Pseudomonas sp.</i>	DLACGYVPRKSAKRASRIEWEHIVPAWQIGHLRQCWQNGGRKNCTKSDPVYKRAEADLH		98
	* *** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *		* * *
<i>V.salmonicida</i>	NLVPAGEVNGDRSNFRFSQWNGSKGAFYGCQAFKVDKGRVAEPPAQSRGAIARTYLYM		160
<i>V.cholerae</i>	NLTPAGEVNGDRSNFRFSQWNGIDGVTYGCQCEMNVNFKERTAMPPEARARGAIARTYLYM		158
<i>Oceanimonas sp.</i>	NLVPAGEVNGDRSNFRFSEWNG-KPVYGCQCMQMLVDFKGRKVQPEQSRGAIARTYLYM		158
<i>Salmonella sp.</i>	NLQPAIGEVDGRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQCAMKVDFKAKLAEPARARGAIARTYLYM		157
<i>Enterobacter sp.</i>	NLQPAVGEVNGDRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQCMKVDFKEKVAEPARARGAIARTYLYM		157
<i>Yokenella sp.</i>	NLQPAVGEVNGDRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQCAMKVDFKGRVAEPPARARGAIARTYLYM		157
<i>Klebsiella sp.</i>	NLQPAVGEVNGDRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQTMKVDFKDKIAEPARARGAIARTYLYM		157
<i>E.coli</i>	NLQPSVGEVNGDRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQCAMKVDFKEKVAEPARARGAIARTYLYM		157
<i>Shigella sp.</i>	NLQPSVGEVNGDRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQCAMKVDFKEKAAEPARARGAIARTYLYM		157
<i>Citrobacter sp.</i>	NLQPAVGEVNGDRANFMYSQWNG-GEGQYGCQCAMKVDFKEKVAEPARARGAIARTYLYM		157
<i>Cronobacter sp.</i>	NLQPAVGEVNGDRGNFLYSQWRG-GEGQYGCQCEMNVDFKKNQAEPPARARGAIARTYLYM		158
<i>Rahnella sp.</i>	NLEPAIGEVDGRNFMYSQWNG-GEGQYGRCEMKIDFKAKAAEPARARGAIARTYLYM		170
<i>Erwinia sp.</i>	NLQPAIGEVDGRGNFMYSQWNG-GEGQYGCQCAMKVDFKKNLAEPARARGAIARTYLYM		170
<i>Yersinia sp.</i>	NLQPAIGEVDGRNFMYSQWNG-GSQYGCQCAMKVDFKKNLAEPVVRARGAIARTYLYM		157
<i>Serratia sp.</i>	NLQPAIGEVDGRNFMYSQWRG-GEGQYGCQPMKVDFKHKQAEPPARARGAIARTYLYM		157
<i>Pseudomonas sp.</i>	NLVPISIGEVDGRSNFSGWVPE-QKGQYGSCLTQVDFKAKKVMRPRPSIRGMIARTYLYM		157
	** * **** * *	** *	** * ** * ** *

Figura 3 (cont.)

<i>V. salmonicida</i>	NNEYKFNL SKAQRQLMEAWN KQYPVSTWECTRDERIAKI QGNHNQFVYKACTK-----	213
<i>V. cholerae</i>	SEQYGLRLSKAQNQLMQAWN NQYPVSEWECVRDQKIEKVQGN SNRFVREQCPN-----	211
<i>Oceanimonas sp.</i>	QQYRLKLIARQQQKLF EAWN RQYPASPWECERDNRI SRIQGNHNP FVQECKNYAYTPNP	218
<i>Salmonella sp.</i>	RDQYQLKLSRQQTQLFN VWDKQYPVTAWECERDARI AKVQGNHNPYVQRACQARKS----	213
<i>Enterobacter sp.</i>	RDRYNLNL SRQQTQLFN AWNKQYPVTEWECQRDERI ARVQGNHNPYVQRACQAQKS----	213
<i>Yokenella sp.</i>	RDRYQLALSRQQTQLFN AWDKQYPVSEWECERDERI AKYQGNHNPYVQRACQAQKS----	213
<i>Klebsiella sp.</i>	RDRYQLNL SRQQTQLFT AWNKQYPVTAWECERDERI AKVQGNHNPYVQQACQAQKS----	213
<i>E. coli</i>	RDQYNLTLSRQQTQLFN AWNKMPVTDWECERDERI AKVQGNHNPYVQRACQARKS----	213
<i>Shigella sp.</i>	RDQYNLTLSRQQTQLFN AWNKMPVTDWECERDERI AKVQGNHNPYVQRACQARKS----	213
<i>Citrobacter sp.</i>	RDQYSLTLSRQQTQLFN AWNKQYPVTDWECERDERI AKVQGNHNPYVQRACQAQKS----	213
<i>Cronobacter sp.</i>	RDKYQLNL SRQQTQLFE AWNKLYPVTWECTRDERI AKVQGNHNPYVQQACQGNR----	214
<i>Rahnella sp.</i>	RDQYKLNLSRQQTQLFT AWD RQYPVTAWECERDNRI ARVQGNHNPYVQQACAQRKS----	226
<i>Erwinia sp.</i>	RDQYQLSMSKQQTQLMT AWSKLYPVTWECERDRRI ARVQGNHNPYVQQACQR-----	223
<i>Yersinia sp.</i>	RDQYQLRLSSQQSKLFG VWD RQYPVTDWECLRDERI AKTQGNHNPYVQRACQRPKS----	213
<i>Serratia sp.</i>	RDRYHLRLSRQQTQLFE VWN RQYPVSQWECQREARI AKVQGNRNPYIQQACQRQKG----	213
<i>Pseudomonas sp.</i>	SKQYNLRLSRQDQQLYQ AWDKTYPPQIWERQRNQVACVMGRGNEFVGPVDLKACK----	213

* * ** * *

Figura 4

↓

<i>V. salmonicida</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDYPT S FYCGCDITWKNKKKGIPPELESCGYQVRKQEKRASRIE 60
<i>V. fischeri</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDHPT S FYCGCDITWKKKKGIPDLQSCGYNVRKQEKRASRIE 60
<i>V. wodanis</i>	APPSSFSKAKKLAVKIYLDHPT S FYCGCDITWKKKKGIPDLESCGYEVKQEKRASRIE 60
<i>V. splendidus</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYLDHPT S FYCGCDITWKKKKGIPDLDGCGYQVRKQQKRASRIE 60
<i>V. cholerae</i>	-APISFSHAKNEAVKIYRDHPV S FYCGCEIRWQGKK-GIPDLESCGYQVRKNENRASRIE 58
<i>V. harveyi</i>	APPSSFSAAKREAVKIYADHPT S FYCGCDIKWQGKK-GIPDLASCGYQVRKQEKRASRIE 59
<i>V. rotiferianus</i>	APPSSFSAAKREAVKIYADHPT S FYCGCDIKWQGKK-GVPDLASCGYQVRKQEKRASRIE 59
<i>V. tubiashii</i>	APPSSFSKAKKEAVKIYADHPT S FYCGCNISWQGRK-GIPDLESCGYQVRKQQKRASRIE 59
<i>V. sinaloensis</i>	APPSSFSKAKKEAIKIYADHP S FYCGCDITWQGRK-GTPDLNSCGYQVRKQEKRASRIE 59
<i>V. vulnificus</i>	APPSSFSAAKQQAVKIYQDHP I SFYCGCDIEWQGKK-GIPNLETCCGYQVRKQQTRASRIE 59
<i>V. furnissii</i>	-APASFSAAKREAVKIYQDHPV T FYCGCDIQWQGKK-GTPDLKGCYQVRKQEKRASRIE 58
<i>V. anguillarum</i>	APPASFSAKKEALKIYDHPV S FYCGCDIAWQGRK-GTPDLQACGYQVRKQQTRASRIE 59
	* * * * *
<i>V. salmonicida</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W Q Q GG R KN C TRNDK Q F K SMEADLHNLVPAIGEVNGDRSNFRFSQ 120
<i>V. fischeri</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W D Q GG R KN C TRKDK Q F K LMEADLHNLVPAIGEVNGDRSNFRFSQ 120
<i>V. wodanis</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W D Q GG R KN C T K NDKN F K M MEADLHNLVPAIGEVNGDRSNFRFSQ 120
<i>V. splendidus</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W D Q GG R KN C TRNDK V F K SMEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 120
<i>V. cholerae</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ L Q C W Q Q G GR K NC T RT S PE F N Q MEADLHNLTPAIGEVNGNRSNFSFSQ 118
<i>V. harveyi</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W Q Q GG R KN C TRND N V F K S MEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 119
<i>V. rotiferianus</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W Q Q GG R KN C TRNDK V F K SMEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 119
<i>V. tubiashii</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W Q Q GG R KN C T K ND K A F R M MEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 119
<i>V. sinaloensis</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W Q Q GG R KN C S K ND N V F R S MEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 119
<i>V. vulnificus</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ L Q C W Q Q G GR K NC S ND Q Q F RLMEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 119
<i>V. furnissii</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ L Q C W Q Q G GR K NC S RD T A F K R MEADLHNLTPAIGEVNGDRSNLNFSQ 118
<i>V. anguillarum</i>	WEHVVPWQF Q FGHQ R Q W Q Q GG R KN C T K ND T I F R S MEADLHNLTPAIGEVNGDRSNFNFSQ 119
	***** * * * * * * * * * *
<i>V. salmonicida</i>	WNGSKAFY G Q C AF K VD F K R V A E P PA Q S R GA I ARTY L Y M N E Y K F N L S KA Q R Q L M E A W N 180
<i>V. fischeri</i>	WNGK G AY Y G Q CAF K VD F K R V A E P PA Q S R GA I ARTY L Y M N Q E Y R F N L S K S Q R Q L M NA W D 180
<i>V. wodanis</i>	WNGSK G AN Y G Q CAF K VD F K R V A E P PA Q S R GA I ARTY M Y M N K E Y R F N L S K A Q R Q L M E A W D 180
<i>V. splendidus</i>	WNS M D G V S Y G Q C E M Q V N F K Q R K V M P P D R A G S I ARTY L Y M S Q E Y G F K L S K Q T N L M M A W N 180
<i>V. cholerae</i>	W N G I D G V T Y G Q C E M Q V N F K E R T A M P P E R A R G A I A R T Y L Y M S E Q Y G L R L S K A Q N Q L M Q A W N 178
<i>V. harveyi</i>	W N G M D G V S Y G R C E M Q V N F K Q R K V M P P D R A R G S I ARTY L Y M S K E Y G F K L S K Q T Q L M S A W N 179
<i>V. rotiferianus</i>	W N G M D G V S Y G R C E M Q V N F K Q R K V M P P D R A R G S I ARTY L Y M S K E Y G F K L S K Q T Q L M S A W N 179
<i>V. tubiashii</i>	W N G I D G V S Y G R C E M Q V N F K H R K V M P P D R A G S I ARTY L Y M S Q E Y G F R L S K Q T Q L M N A W N 179
<i>V. sinaloensis</i>	W N G V D G V S Y G R C E M Q V N F K Q R K V M P P D R A G S I ARTY L Y M S K E Y G F K L S K Q T Q L M T A W N 179
<i>V. vulnificus</i>	W N G M D G V S Y G R C E M Q V N F K Q R K V M P P D R A R G S I ARTY L Y M S Q E Y G F Q L S K Q Q Q L M Q A W N 179
<i>V. furnissii</i>	W H G I D G A T Y G Q C E I Q V N F Q Q R K V M P P E R A R G A I A R T Y L Y M S Q E Y G F R L S K S Q T Q L M Q V W N 178
<i>V. anguillarum</i>	W N G V E G E S Y G R C E M Q V D F K Q R K V M P P D R A R G S I ARTY L Y M S Q N Y G F Q L S K S Q T Q L M Q A W N 179
	* * * * *
<i>V. salmonicida</i>	K Q Y P V S T W E C T R D E R I A K I Q G N H N Q F V Y K A C T K- 213
<i>V. fischeri</i>	K Q Y P V S E W E C E R D K R I A K I Q G N H N Q F V Y K A C R K- 213
<i>V. wodanis</i>	K Q Y P V S A W E C E R D Q R I A K I Q G N H N Q F V F K A C T K- 213
<i>V. splendidus</i>	K Q F P V N E W E C T R D E R I F A I Q G N H N P F V Y Q A C K - 212
<i>V. cholerae</i>	N Q Y P V S E W E C V R D Q K I E K V Q G N S N R F V R E Q C P N- 211
<i>V. harveyi</i>	K S Y P V D K W E C E R D E R I A K I Q G N H N P F V Q E A C R A- 212
<i>V. rotiferianus</i>	K T Y P V D K W E C E R D E R I A K I Q G N H N P F V Q E A C R A- 212
<i>V. tubiashii</i>	K Q F P V D H W E C E R E Q R I F K V Q G N H N P F V H Q A C Q A L 213
<i>V. sinaloensis</i>	K Q F P V D E W E C E R D K R I F K V Q G N H N P----- 204
<i>V. vulnificus</i>	K S Y P V D E W E C T R D D R I A K I Q G N H N P F V Q Q S C T V R 213
<i>V. furnissii</i>	R Q Y P V D S W E C E R D Q R I F K V Q G N H N P F V R Q Q C S S- 211
<i>V. anguillarum</i>	R Q Y P A D E W E C K R D Q R I A K V Q G N H N P F V Q Q C R S - 212
	* * * * *

Figura 5

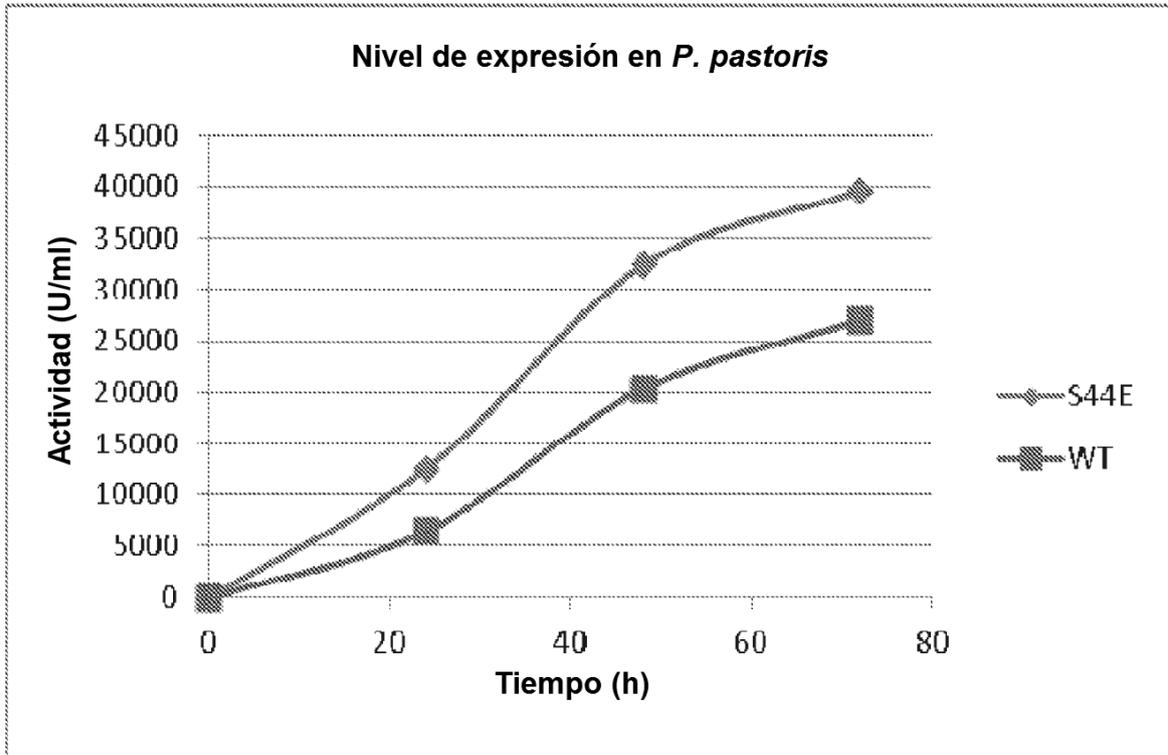


Figura 6a

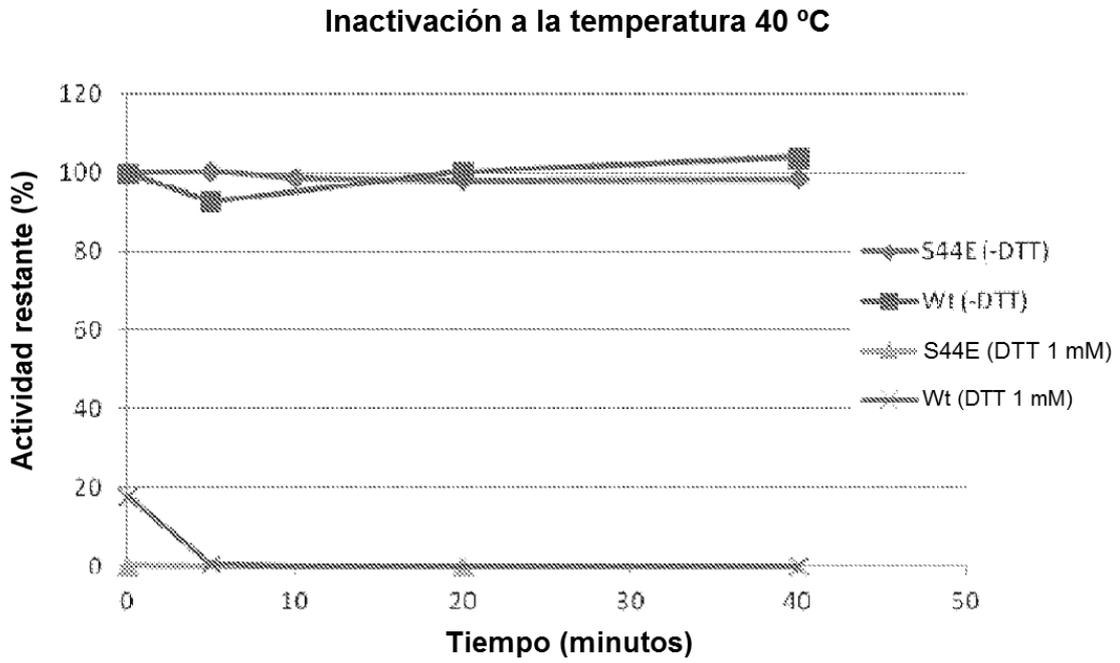


Figura 6b

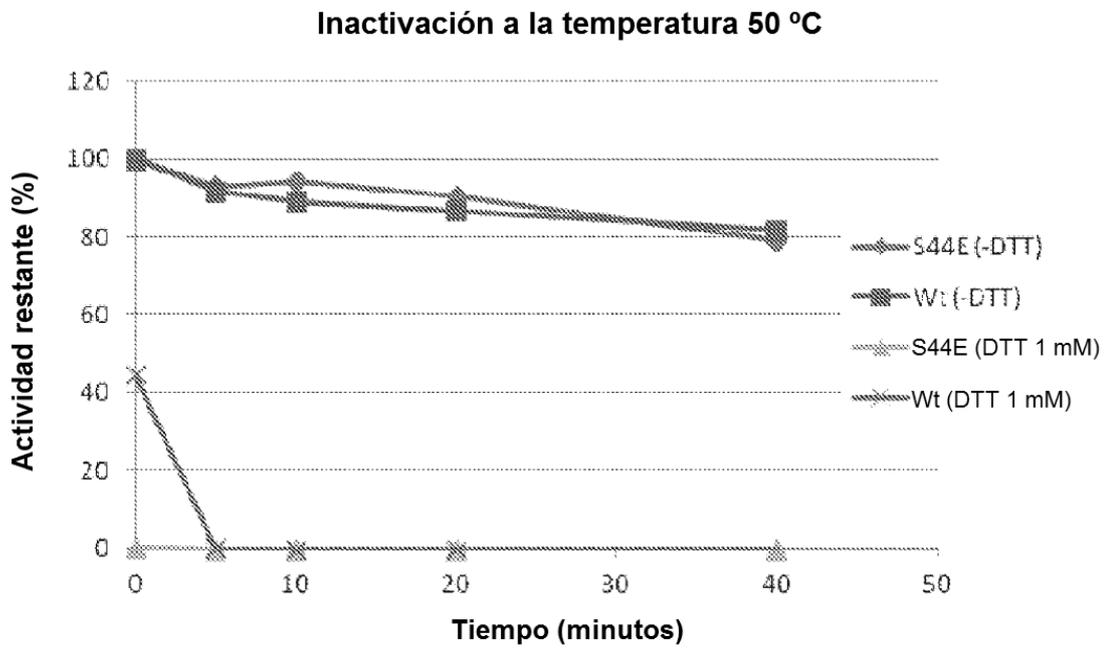


Figura 7

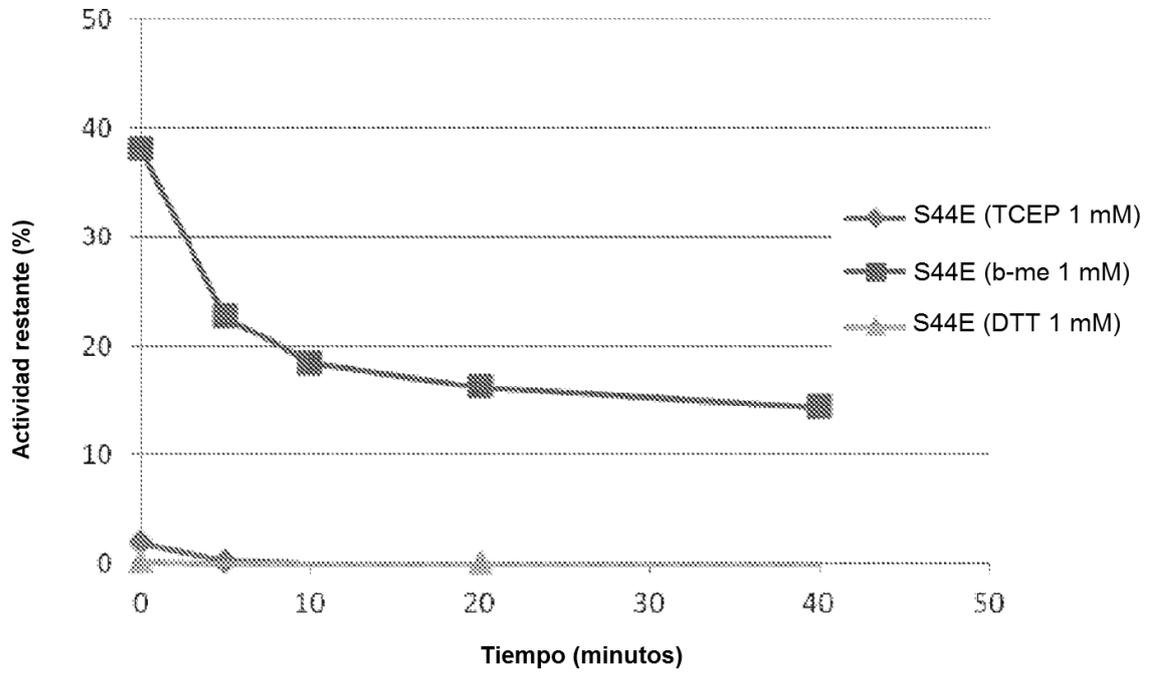


Figura 8c

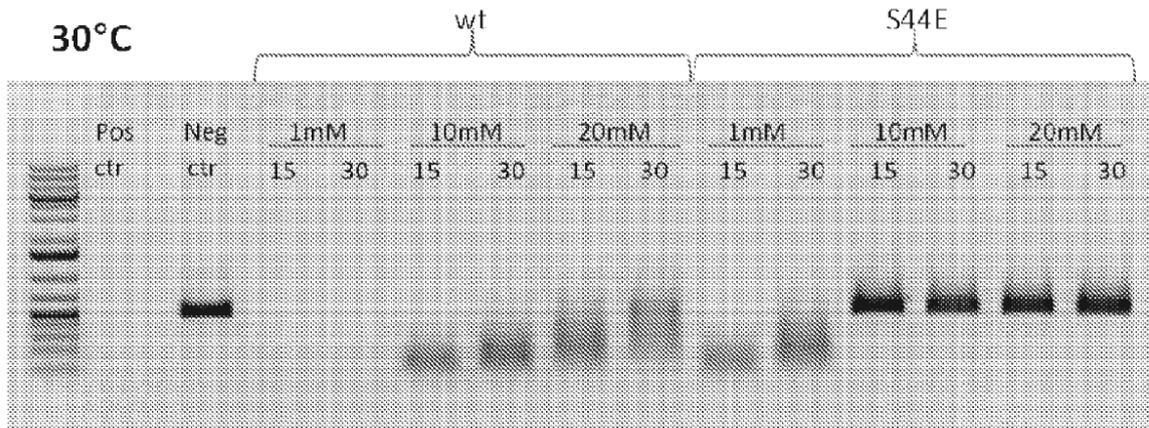


Figura 8d

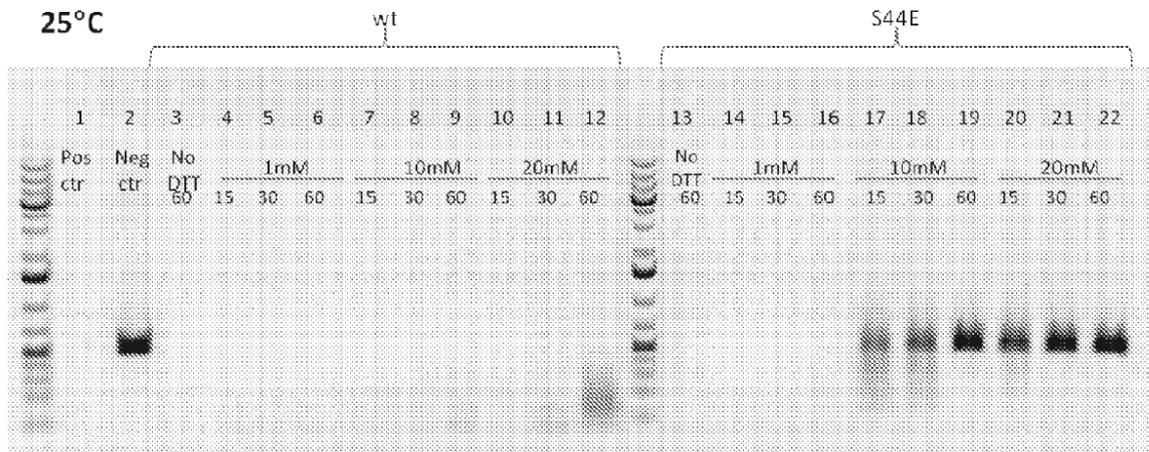


Figura 9a

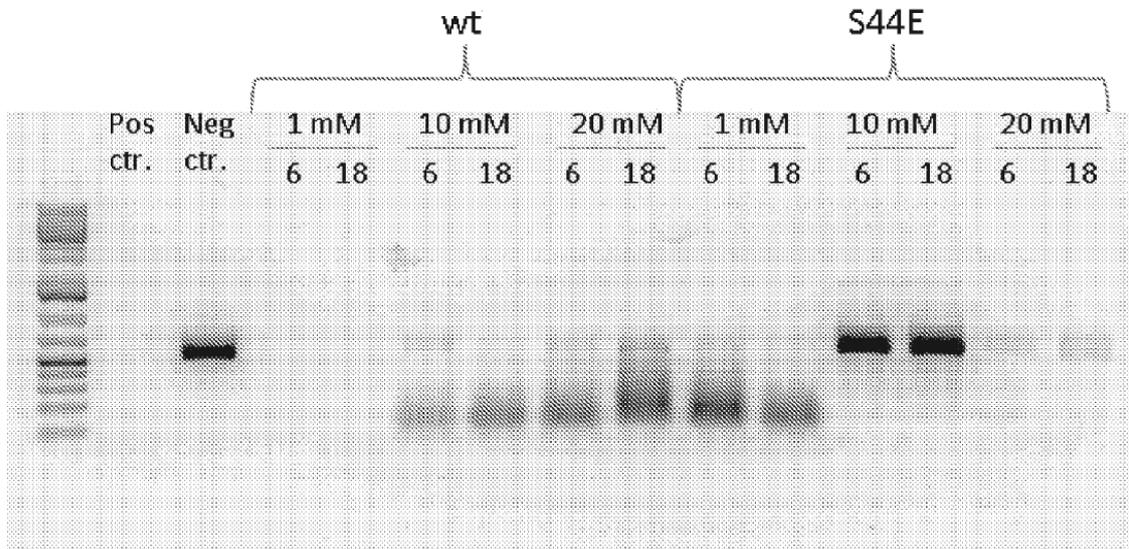


Figura 9b

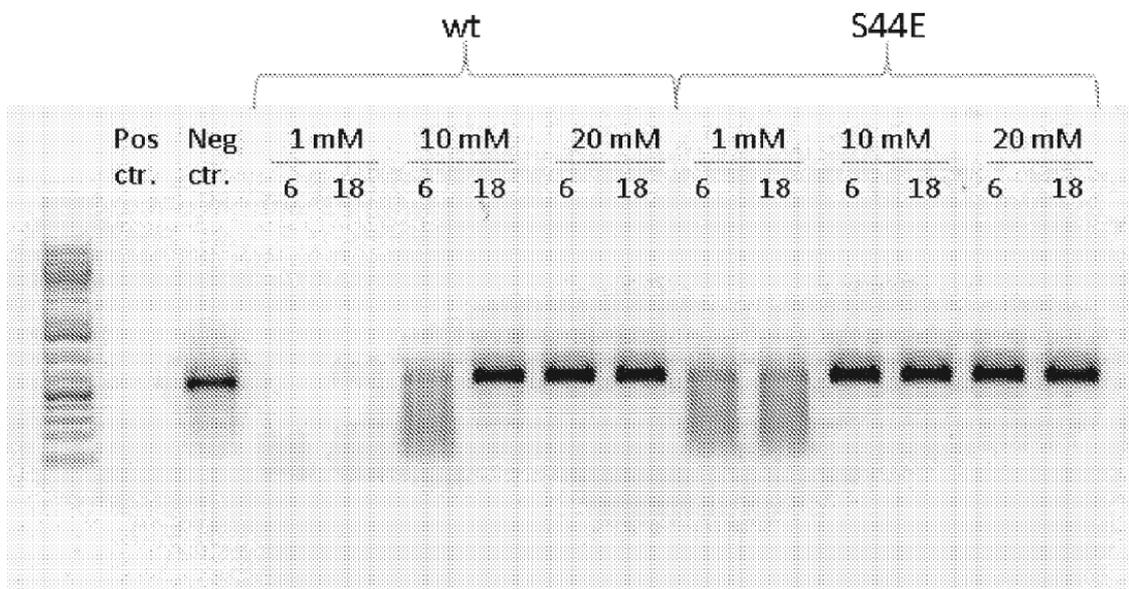


Figura 10a

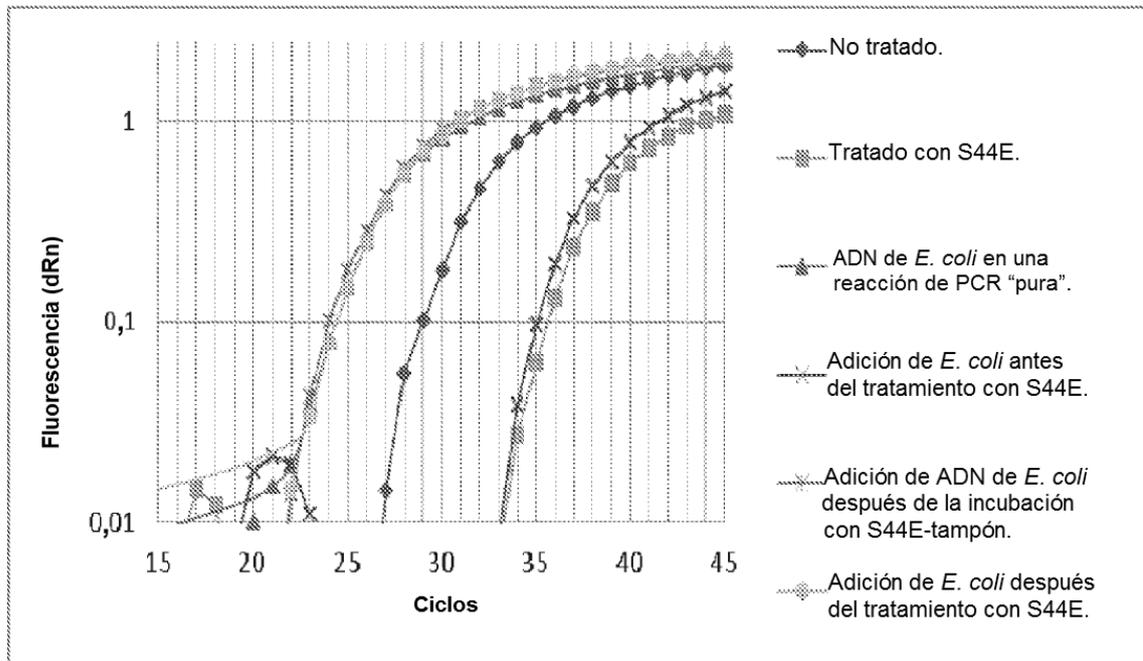


Figura 10b

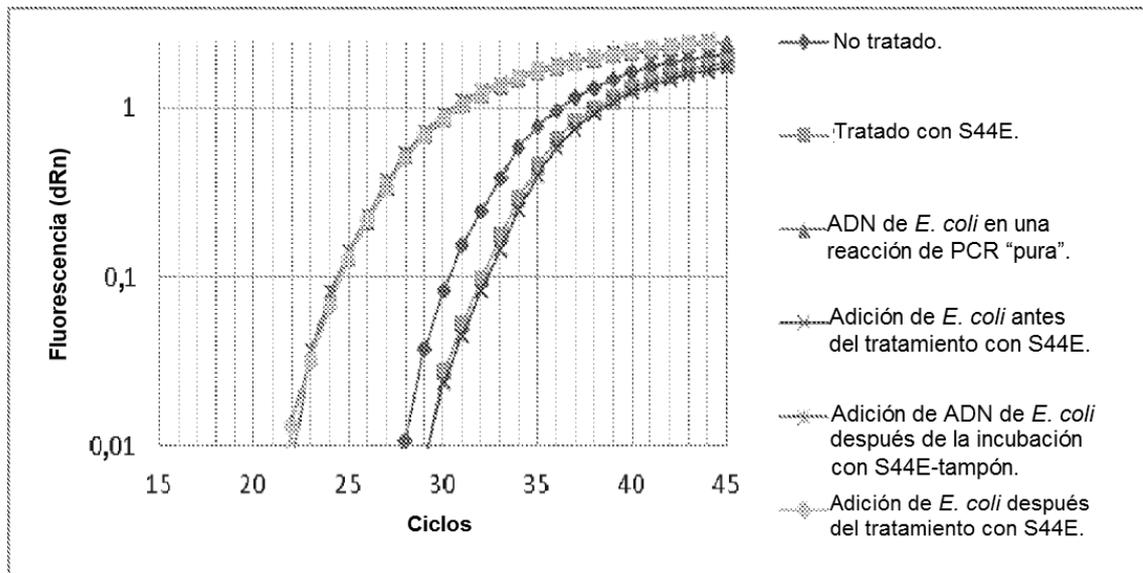


Figura 11

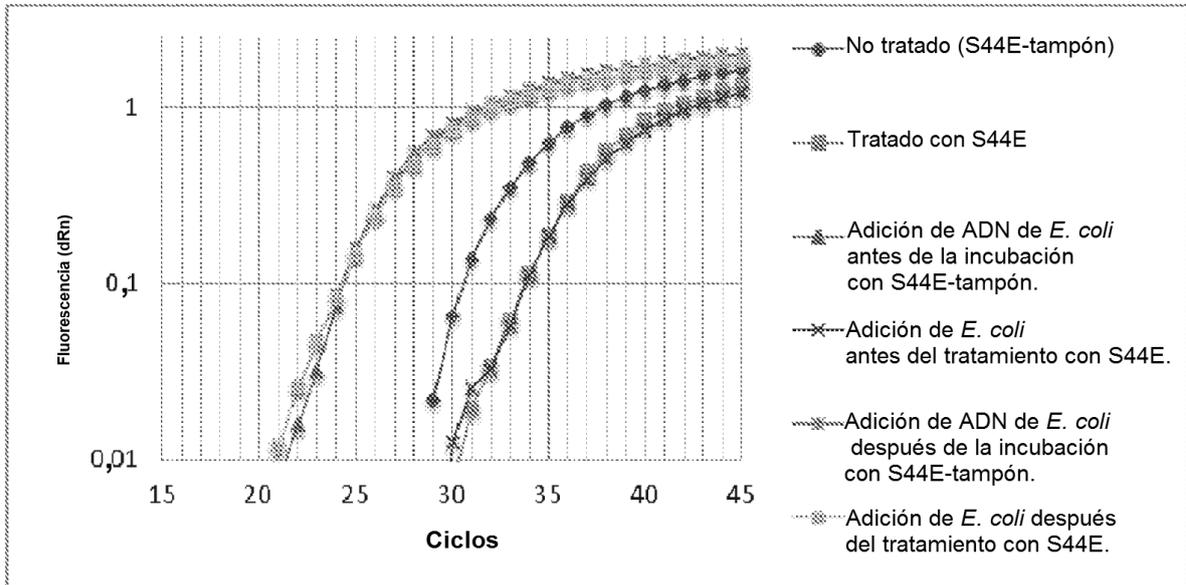


Figura 12a

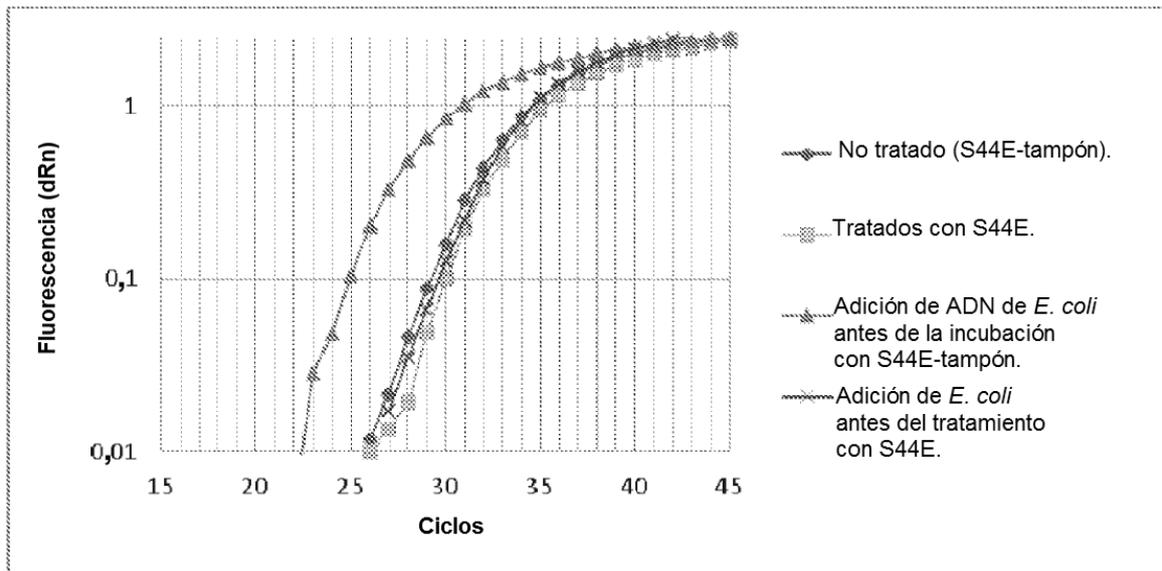


Figura 12b

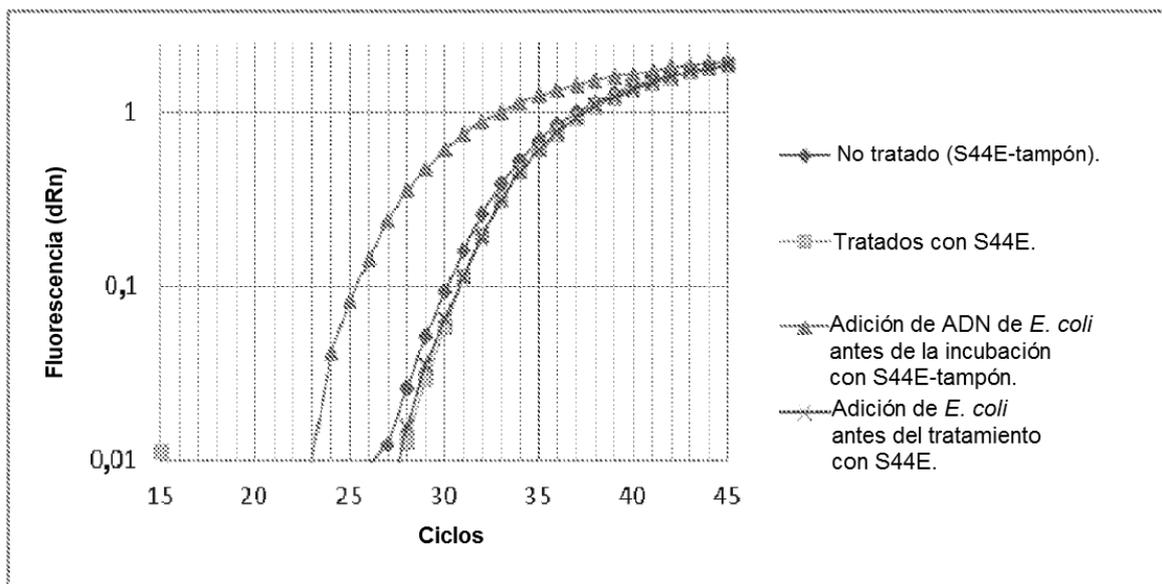


Figura 13

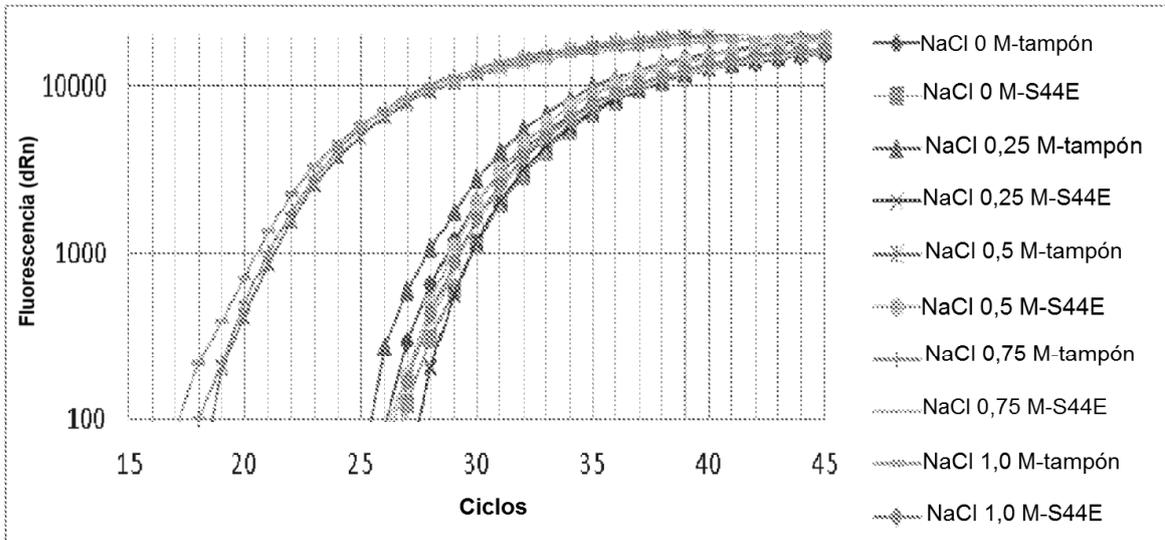


Figura 14

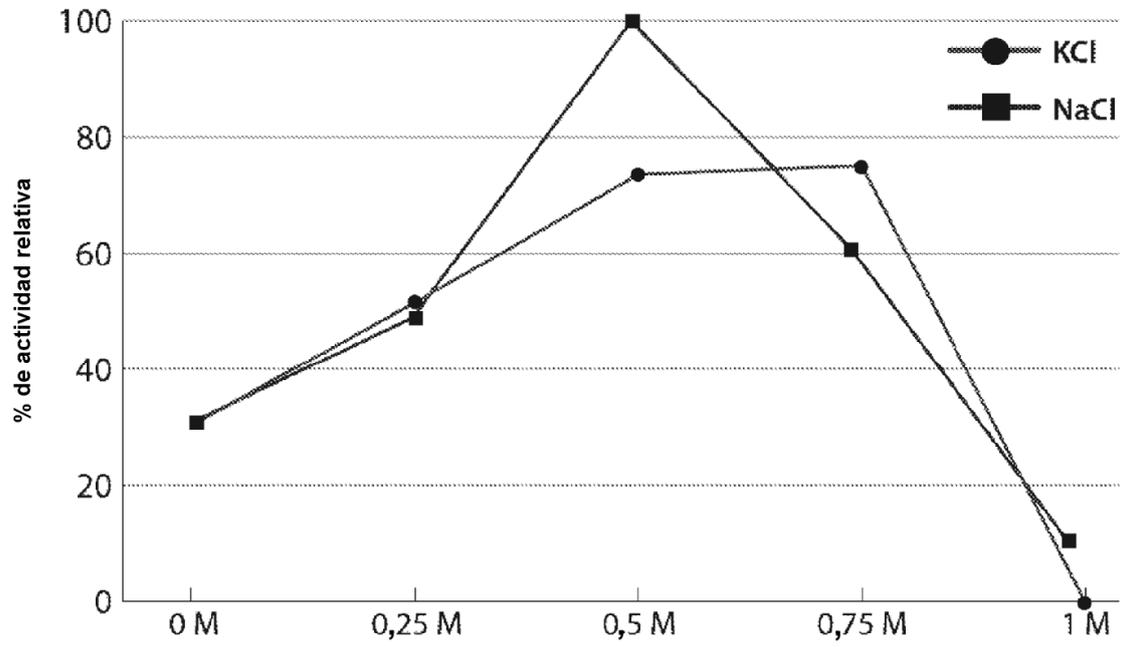


Figura 15

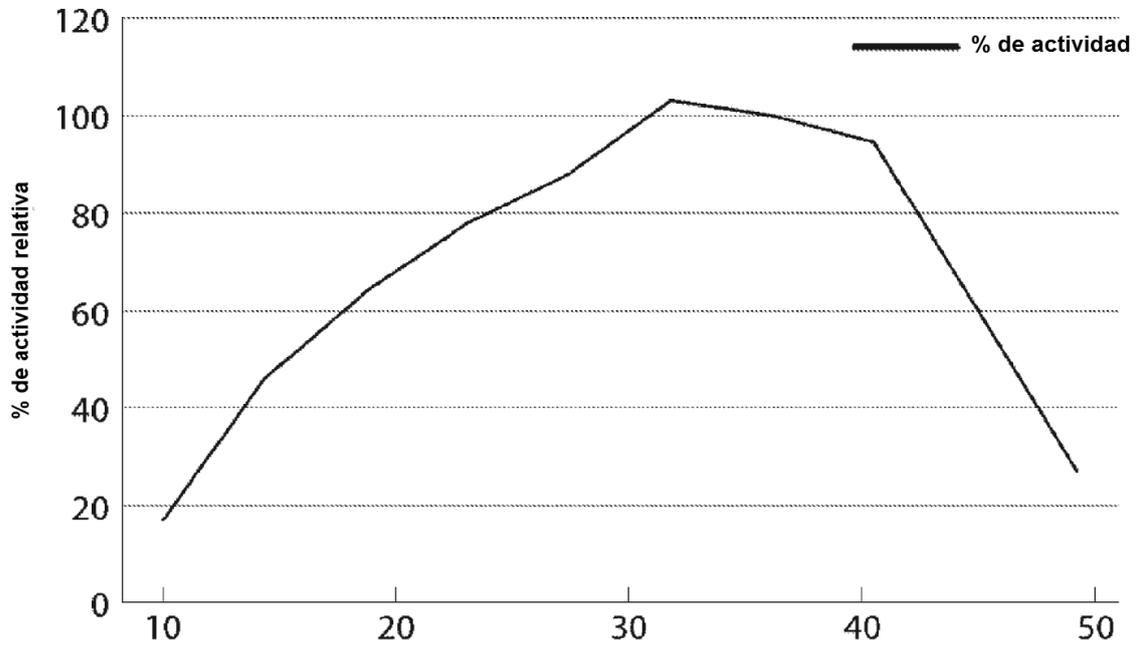


Figura 16a

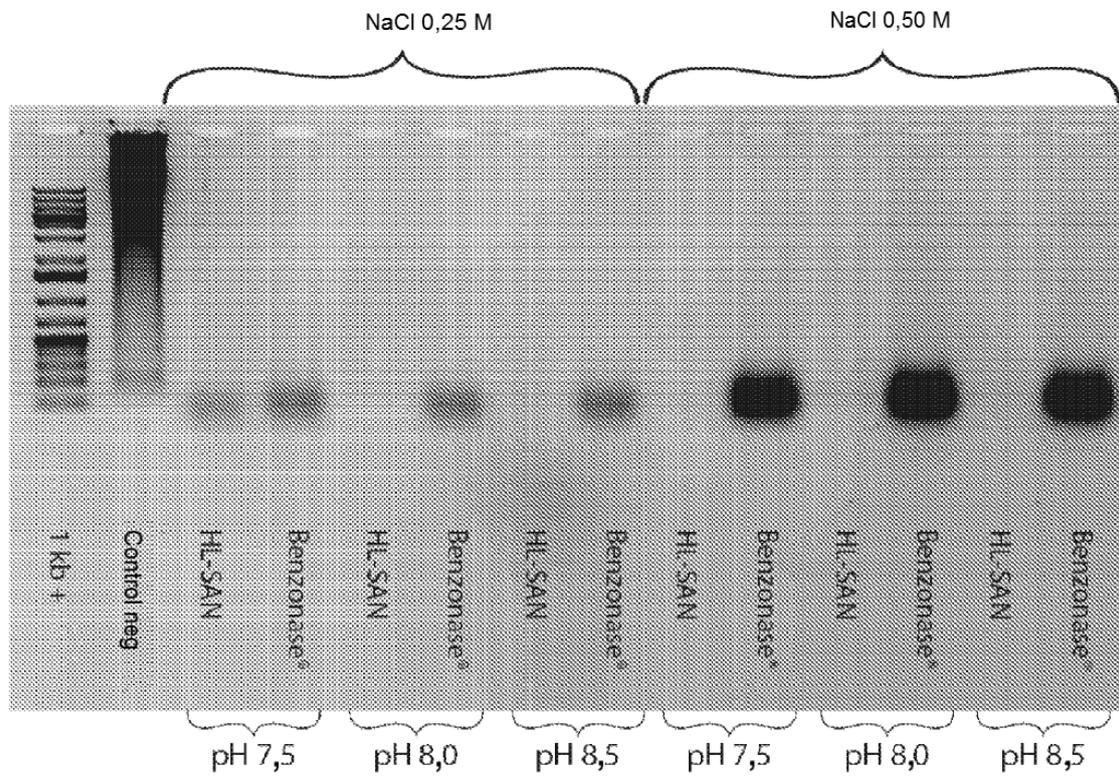


Figura 16b

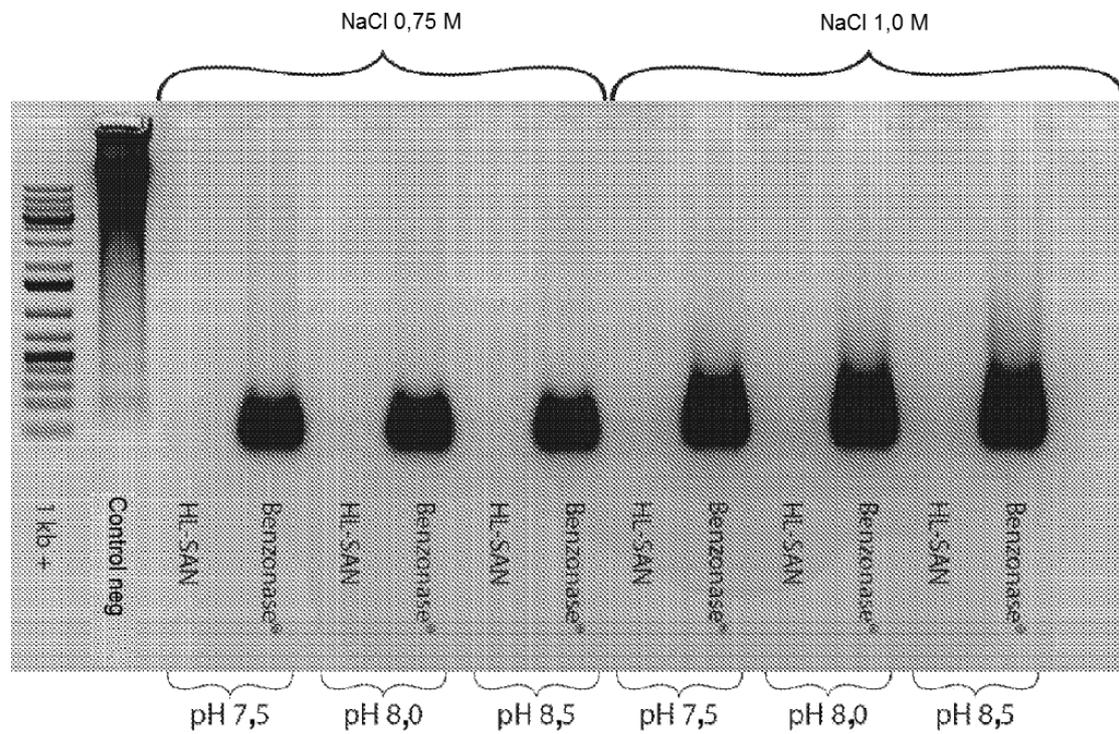


Figura 17

