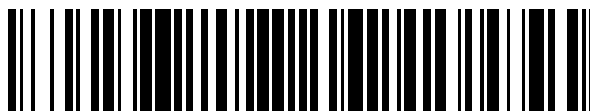


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 313**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006** **E 16157104 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017** **EP 3056575**

54 Título: **Polimerasas para la incorporación de análogos nucleotídicos**

30 Prioridad:

22.12.2005 US 753670 P

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

29.12.2017

73 Titular/es:

**PACIFIC BIOSCIENCES OF CALIFORNIA, INC.
(100.0%)
1305 O'Brien Drive
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**HANZEL, DAVID, K.;
OTTO, GEOFF;
MURPHY, DEVON;
PELUSO, PAUL;
PHAM, THANG;
RANK, DAVID, R.;
MITSIS, PAUL;
CHRISTIANS, FRED, C.;
BIBILLO, AREK;
PARK, INSIL;
CLARK, SONYA y
LYLE, JOHN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 648 313 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

Polimerasas para la incorporación de análogos nucleotídicos

5 Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud es una solicitud de patente de modelo de utilidad no provisional que reivindica prioridad a y el beneficio de la siguiente solicitud de patente provisional previa: USSN 60/753.670, presentada el 22 de diciembre de 2005, titulada "POLYMERASES FOR NUCLEOTIDE ANALOGUE INCORPORATION" de David K. Hanzel et al.

10 Declaración de derechos a invenciones realizadas bajo investigación y desarrollo con patrocinio federal.

Partes de la invención se hicieron con el apoyo gubernamental según concesión NHGRI n.º R01 HG003710-01, y el gobierno puede tener ciertos derechos sobre la invención.

15 Campo de la invención

La invención se refiere a polimerasas con características para mejorar la entrada de análogos nucleotídicos en regiones de sitios activos y para coordinarse con los análogos nucleotídicos en la región del sitio activo. También se describen métodos para preparar las polimerasas y para usar las polimerasas en la secuenciación y replicación y amplificación del ADN, así como modelos cinéticos de la actividad polimerasa y los métodos implementados por ordenador del uso de los modelos.

25 Antecedentes de la invención

Las ADN polimerasas replican los genomas de organismos vivos. Además de su función central en biología, las ADN polimerasas también son herramientas ubicuas de la biotecnología. Se usan ampliamente, por ejemplo, para la transcripción inversa, la amplificación, el marcaje y la secuenciación, que son tecnologías centrales para una diversidad de aplicaciones tales como secuenciación, amplificación de ácidos nucleicos, clonación, ingeniería de proteínas, diagnóstico, medicina molecular y muchas otras tecnologías.

A causa de la importancia de las ADN polimerasas, se han estudiado ampliamente. Este estudio se ha centrado, por ejemplo, en las relaciones filogenéticas entre las polimerasas, la estructura de las polimerasas, las características de estructura-función de las polimerasas, y la función de las polimerasas en la replicación del ADN y otras cuestiones básicas de biología, así como las maneras de usar las ADN polimerasas en biotecnología. Para una recapitulación de las polimerasas, véase, por ejemplo, Hubscher et al. (2002) EUKARYOTIC DNA POLYMERASES Annual Review of Biochemistry Vol. 71: 133-163; Alba (2001) "Protein Family Review: Replicative DNA Polymerases" Genome Biology 2(1): revisiones 3002.1-3002.4; Steitz (1999) "DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms" J Biol Chem 274: 17395-17398 y Burgers et al. (2001) "Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature" J Biol Chem. 276(47):43487-90. Se ha resuelto la estructura cristalina para muchas polimerasas, que a menudo comparten una arquitectura similar. Se han determinado los mecanismos básicos de acción para muchas polimerasas.

Una aplicación fundamental de la tecnología del ADN implica diversas estrategias de marcaje para marcar un ADN que se produce por una ADN polimerasa. Esto es útil en la tecnología de micromatrices, secuenciación del ADN, detección de SNP, clonación, análisis por PCR y muchas otras aplicaciones. El marcaje a menudo se realiza en diversos esquemas de hibridación y marcaje químico posteriores a la síntesis, pero las ADN polimerasas también se han usado para incorporar directamente diversos nucleótidos marcados en una diversidad de aplicaciones, por ejemplo, mediante traslado de mella, transcripción inversa, cebado aleatorio, amplificación, la reacción en cadena de la polimerasa, etc. Véase, por ejemplo, Giller et al. (2003) "Incorporation of reporter molecule-labeled nucleotides by DNA polymerases. I. Chemical synthesis of various reporter group-labeled 2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphates" Nucleic Acids Res. 31(10): 2630-2635; Augustin et al. (2001) "Progress towards single-molecule sequencing: enzymatic synthesis of nucleotide-specifically labeled DNA" J. Biotechnol., 86:289-301; Tonon et al. (2000) "Spectral karyotyping combined with locus-specific FISH simultaneously defines genes and chromosomes involved in chromosomal translocations" Genes Chromosom. Cancer 27:418-423; Zhu y Waggoner (1997) "Molecular mechanism controlling the incorporation of fluorescent nucleotides into DNA by PCR." Cytometry, 28:206-211. Yu et al. (1994) "Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes" Nucleic Acids Res., 22:3226-3232; Zhu et al. (1994) "Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers." Nucleic Acids Res. 22:3418-3422; Ried et al. (1992) "Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy" Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:1388-1392.

Se han identificado mutantes de ADN polimerasa que tienen propiedades alteradas de incorporación de análogos nucleotídicos respecto a las enzimas equivalentes de tipo silvestre. Por ejemplo, la ADN polimerasa Vent^{A488L} puede incorporar ciertos nucleótidos no convencionales con una mayor eficacia que la ADN polimerasa Vent nativa. Véase, Gardner et al. (2004) "Comparative Kinetics of Nucleotide Analog Incorporation by Vent DNA Polymerase" J. Biol.

Chem., 279(12), 11834-11842; Gardner y Jack "Determinants of nucleotide sugar recognition in an archaeon DNA polymerase" Nucleic Acids Research, 27(12) 2545-2553. Se prevé que el resto alterado en este mutante, A488, estará enfocado en dirección contraria al sitio de unión de nucleótidos de la enzima. El patrón de especificidad relajada en esta posición se correlaciona aproximadamente con el tamaño de la cadena lateral del aminoácido sustituido y afecta a la incorporación por parte de la enzima de una diversidad de azúcares de nucleótidos modificados.

La capacidad de mejorar la especificidad, la capacidad de procesamiento u otras características de las ADN polimerasas hacia análogos nucleotídicos marcados sería muy deseable en una diversidad de contextos en los que, por ejemplo, se desee el marcaje de ácidos nucleicos, incluyendo la amplificación, secuenciación, marcaje, detección, clonación de ADN y muchas otras. La presente invención proporciona nuevas ADN polimerasas con propiedades modificadas para análogos nucleotídicos marcados, métodos de preparación de dichas polimerasas, métodos de uso de dichas polimerasas y muchas otras características que llegarán a ser evidentes tras una recapitulación completa de lo siguiente.

Sumario de la invención

La invención incluye polimerasas que incorporan análogos nucleotídicos, tales como análogos de fosfato, en una copia de molde en crecimiento, durante la amplificación del ADN. Sin comprometerse a teoría particular alguna de funcionamiento, estas polimerasas se modifican opcionalmente de manera que el sitio activo de la polimerasa se modifique para reducir la inhibición estérica de la entrada del análogo en el sitio activo y/o para proporcionar complementariedad a una o más características no naturales del análogo nucleotídico. Dichas polimerasas son particularmente muy adecuadas para la amplificación del ADN y/o aplicaciones de secuenciación, incluyendo aplicaciones a tiempo real, por ejemplo, en el contexto de protocolos de amplificación o secuenciación que incluyen la incorporación de restos análogos en el ADN por la polimerasa. El resto análogo que se incorpora puede ser igual que un resto natural, por ejemplo, en el que un marcador u otro motivo del análogo se retira por la acción de la polimerasa durante la incorporación, o el resto análogo puede tener una o más características que lo distingue de un resto nucleotídico natural.

Por consiguiente, la invención incluye composiciones que incluyen una ADN polimerasa recombinante. La ADN polimerasa recombinante incluye una región de sitio activo modificada que es homóloga a una región de sitio activo de tipo silvestre de una ADN polimerasa de tipo silvestre. La región de sitio activo modificada incluye una o más modificaciones estructurales respecto a la región de sitio activo de tipo silvestre que mejora la actividad deseada de la enzima, por ejemplo, hacia nucleótidos de origen natural y/o análogos nucleotídicos. En ciertos aspectos, y son comprometerse a teoría particular alguna de funcionamiento, dichas modificaciones incluyen aquellas que reducen la inhibición estérica para la entrada de un nucleótido natural o análogo nucleotídico en la región de sitio activo modificada y/o que hacen que la región de sitio activo sea complementaria a uno o más características no naturales del nucleótido natural y/o análogo nucleotídico. La ADN polimerasa recombinante presenta una propiedad modificada para el análogo nucleotídico en comparación con la polimerasa de tipo silvestre.

Una diversidad de ADN polimerasas se modifican opcionalmente para que incluyan la región de sitio activo modificada. Por ejemplo, la ADN polimerasa recombinante es opcionalmente homóloga a una ADN polimerasa $\Phi 29$ o mutante de la misma, una polimerasa Taq, una polimerasa Taq de actividad exonucleasa defectuosa, una ADN polimerasa Pol I, una polimerasa T7, una polimerasa RB69, una polimerasa T5 o una polimerasa correspondiente a un fragmento Klenow de una ADN polimerasa Pol I. Por ejemplo, la ADN polimerasa recombinante puede ser homóloga a una ADN polimerasa $\Phi 29$ de tipo silvestre o de actividad exonucleasa defectuosa, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.001.050, 5.198.543 o 5.576.204. Asimismo, la ADN polimerasa recombinante puede ser homóloga a $\Phi 29$, B103, GA-1, PZA, $\Phi 15$, BS32, M2Y, Nf, G1, Cp-1, PRD1, PZE, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722 o L17, o similares. Para cuestiones de nomenclatura, véase también, Meijer et al. (2001) " $\Phi 29$ Family of Phages" Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(2):261-287.

La región de sitio activo modificada puede incluir cualquiera de una diversidad de diferentes modificaciones para reducir la inhibición estérica y/o para hacer que la región sea complementaria a una o más características no naturales del análogo nucleotídico.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende:

una ADN polimerasa recombinante, comprendiendo dicha polimerasa recombinante una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEQ ID NO:1 y comprende una sustitución de aminoácido en un sitio correspondiente a K512 respecto a la SEQ ID NO:1; y
un análogo nucleotídico que está marcado en un grupo fosfato, en el que el resto de base del análogo se selecciona del grupo que consiste en adenina, timina, guanina y citidina.

La polimerasa también puede incluir una mutación adicional o combinación de mutaciones seleccionadas de las enumeradas en la tabla 8.

La polimerasa opcionalmente incluye además una o más mutaciones/eliminaciones respecto a la polimerasa de tipo silvestre que reducen o eliminan la actividad exonucleasa endógena. Por ejemplo, respecto a la ADN polimerasa $\Phi 29$ de tipo silvestre, N62 opcionalmente se muta o se elimina para reducir la actividad exonucleasa; por ejemplo, la polimerasa puede incluir una mutación N62D. Otras mutaciones ejemplares que reducen la actividad exonucleasa incluyen: D12A, T15I, E14I y/o D66A; por consiguiente, las polimerasas de la invención opcionalmente comprenden una o más de estas mutaciones.

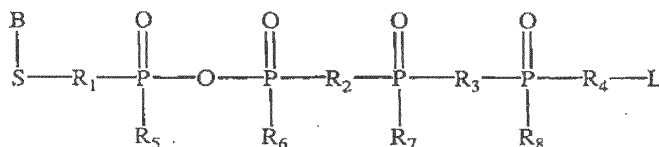
La ADN polimerasa recombinante opcionalmente incluye características adicionales exógenas o heterólogas a una ADN polimerasa correspondiente, tal como una polimerasa de tipo silvestre o de actividad nucleasa defectuosa. Por ejemplo, la polimerasa recombinante opcionalmente incluye una o más marcas de afinidad exógenas, por ejemplo, marcas de purificación o de unión a sustrato, tales como una secuencia de marca de 6 His, una marca GST, una secuencia de marca HA, una pluralidad de secuencias de marca de 6 His, una pluralidad de marcas GST, una pluralidad de secuencias de marca HA, una marca SNAP o similares. Estas pueden insertarse en cualquiera de una diversidad de posiciones dentro de la proteína, y están preferentemente en uno o más extremos, por ejemplo, el extremo C-terminal o N-terminal de la proteína y, más preferentemente, están en el extremo más distal del sitio activo en la estructura 3D de la proteína.

Las polimerasas ejemplares de la invención incluyen las enumeradas en la tabla 3.

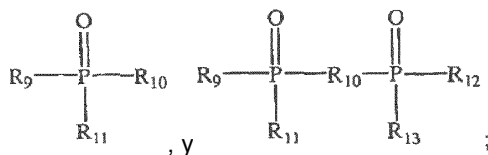
Las composiciones opcionalmente incluyen el análogo nucleotídico. Los análogos nucleotídicos ejemplares incluyen aquellos que incluyen fluoróforos y/o restos colorantes. Por ejemplo, el análogo nucleotídico puede ser un nucleótido marcado, por ejemplo, un nucleótido de base, azúcar y/o fosfato marcado. El análogo puede ser un análogo monodesoxi- o didesoxinucleotídico.

Una clase ejemplar de análogos nucleotídicos son análogos nucleotídicos de fosfato marcado, incluyendo análogos monodesoxinucleotídicos de fosfato marcado y/o análogos didesoxinucleotídicos de fosfato marcado. Por ejemplo, el análogo nucleotídico puede ser un análogo nucleotídico marcado que tiene de 3 a 6 grupos fosfato (por ejemplo, en el que el análogo nucleotídico es un trifosfato, un tetrafosfato, un pentafofosfato o un hexafofosfato).

Por ejemplo, la composición puede incluir un compuesto marcado de fórmula:



en la que B es una nucleobase (obsérvese que B opcionalmente incluye un marcador); S se selecciona de un resto de azúcar, un resto ácido o un resto carbocíclico (obsérvese que S opcionalmente incluye un marcador); L es un marcador detectable opcional; R_1 se selecciona de O y S; R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de O, NH, S, metileno, metileno sustituido, C(O), C(CH₂), CNH₂, CH₂CH₂, C(OH)CH₂R en el que R es 4-piridina o 1-imidazol, con la condición de que R_4 pueda seleccionarse adicionalmente de



R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_{11} y R_{13} , cuando están presentes, se seleccionan cada uno independientemente de O, BH₃ y S; y R_9 , R_{10} y R_{12} se seleccionan independientemente de O, NH, S, metileno, metileno sustituido, CNH₂, CH₂CH₂, C(OH)CH₂R en el que R es 4-piridina o 1-imidazol. En algunos casos, pueden emplearse análogos fosfonato como análogos, por ejemplo, en los que uno de R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} o R_{12} no son O, por ejemplo, son metilo, etc.

La ADN polimerasa recombinante presenta una propiedad modificada para el análogo nucleotídico en comparación con la polimerasa de tipo silvestre. Por ejemplo, la propiedad modificada puede ser, por ejemplo, K_m , k_{cat} , V_{max} , capacidad de procesamiento de la polimerasa recombinante en presencia del análogo nucleotídico (o de un nucleótido de origen natural), longitud de lectura del molde promedio por la polimerasa recombinante en presencia del análogo nucleotídico, especificidad de la polimerasa recombinante por el análogo nucleotídico, tasa de unión del análogo nucleotídico, tasa de liberación de producto (pifosfato, trifosfato, etc.) y/o tasa de ramificación. En una realización deseable, la propiedad modificada es una K_m reducida para el análogo nucleotídico y/o una k_{cat}/K_m o V_{max}/K_m aumentada para el análogo nucleotídico. Asimismo, la polimerasa recombinante opcionalmente tiene una tasa aumentada de unión del análogo nucleotídico, una tasa aumentada de liberación de producto y/o una tasa disminuida de ramificación, en comparación con la polimerasa de tipo silvestre.

Al mismo tiempo, la ADN polimerasa recombinante puede incorporar nucleótidos naturales (por ejemplo, A, C, G y T) en un ácido nucleico de copia en crecimiento. Por ejemplo, la polimerasa recombinante opcionalmente presenta una actividad específica para un nucleótido natural que es al menos aproximadamente un 5 % tan elevada (por ejemplo, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % o mayor), como una polimerasa de tipo silvestre correspondiente y una capacidad de procesamiento con nucleótidos naturales en presencia de un molde que es al menos un 5 % tan elevada (por ejemplo, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % o mayor) como la polimerasa de tipo silvestre en presencia del nucleótido natural. Opcionalmente, la polimerasa recombinante presenta una k_{cat}/K_m o V_{max}/K_m para un nucleótido de origen natural que es al menos aproximadamente un 5 % tan elevada (por ejemplo, aproximadamente un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 % o mayor) como la polimerasa de tipo silvestre.

El análogo nucleotídico y un molde de ADN se incluyen opcionalmente en las composiciones de la invención, por ejemplo, en que la polimerasa recombinante incorpora el análogo nucleotídico en un ácido nucleico de copia en respuesta al ADN molde. El ADN molde puede ser un ADN lineal o circular, y en ciertas aplicaciones de secuenciación se desea un molde circular. Por tanto, la composición puede estar presente en un sistema de amplificación y/o secuenciación de ADN. Opcionalmente, en una clase de realizaciones, el sistema de secuenciación comprende un Zero Mode Waveguide.

Los métodos de preparación y uso de las composiciones también son características de la invención. Por ejemplo, en un aspecto, se proporcionan métodos de preparación de un ADN, por ejemplo, que comprende uno o más restos de análogos nucleotídicos. En estos métodos, se proporciona una mezcla de reacción. La mezcla de reacción típicamente incluye aquellos componentes que puede replicar al menos parcialmente un molde, por ejemplo, un molde, nucleótidos, la polimerasa y un resto de inicio de la replicación que forma complejos con el molde, o está integrado en el mismo, para cebar la polimerasa. El resto de inicio de la replicación en este contexto es cualquier resto que pueda servir como sitio para iniciar la actividad polimerasa, por ejemplo, un oligonucleótido diferentes complementario al molde, una horquilla u otra región de autocomplementariedad de un molde (por ejemplo, una horquilla en un molde monocatenario), una proteína terminal o similares. La polimerasa es una polimerasa recombinante capaz de replicar al menos parcialmente el molde en una reacción de extensión por polimerasa dependiente de molde (por ejemplo, usando el resto de inicio de la replicación como un sitio de inicio). Típicamente, el uno o más nucleótidos comprenden un análogo nucleotídico. En aspectos preferidos, al menos uno, preferentemente dos o más, tres o más o al menos cuatro nucleótidos son análogos nucleotídicos. La ADN polimerasa recombinante tiene un sitio activo modificado (una región de la polimerasa que, cuando se modifica, provoca una alteración en una actividad de la polimerasa) que es homólogo a un sitio activo de tipo silvestre de una ADN polimerasa de tipo silvestre. Como se analiza en el contexto de las composiciones anteriores, el sitio activo modificado puede incluir una o más modificaciones estructurales respecto al sitio activo de tipo silvestre que mejora la actividad de la enzima hacia uno o más nucleótidos naturales y/o análogos nucleotídicos. En al menos un ejemplo, y sin comprometerse a teoría particular alguna de funcionamiento, la modificación del sitio activo reduce la inhibición estérica para la entrada del análogo nucleotídico en el sitio activo modificado y/o la modificación es complementaria a una o más características no naturales del análogo nucleotídico.

La mezcla se hace reaccionar de tal manera que la polimerasa recombinante replica al menos una parte del molde de una manera dependiente de molde, por lo que al menos un resto de análogo nucleotídico se incorpora en el ADN resultante. La incorporación del análogo puede provocar la incorporación de un resto no convencional en el ADN prolongado (por ejemplo, como un resto nucleotídico marcado), o la acción de la polimerasa puede modificar el análogo de tal manera que el resto de análogo nucleotídico incorporado en el ADN prolongado es estructuralmente igual al resto nucleotídico convencional. Por ejemplo, en la última realización, se escinde una diversidad de marcadores por la acción de la polimerasa, por ejemplo, ciertos marcadores de fosfato analizados en más detalle en este documento se escinden del análogo nucleotídico según se incorpora en el ADN en crecimiento (típicamente proporcionando una señal tras la liberación del marcador).

En una clase relacionada de métodos, se proporciona una mezcla de reacción que incluye un molde, un resto de inicio de la replicación, una polimerasa recombinante dependiente de molde y uno o más nucleótidos. El uno o más nucleótidos incluyen un nucleótido de fosfato marcado. Un valor de K_m de la polimerasa recombinante para el análogo nucleotídico es inferior a una K_m para una polimerasa de tipo silvestre homóloga correspondiente para el análogo nucleotídico. La mezcla se hace reaccionar de tal manera que la polimerasa replica al menos parcialmente el molde de una manera dependiente de molde, por ejemplo, por lo que al menos un resto de análogo nucleotídico se incorpora en el ADN resultante. Como se indica previamente, una vez incorporado, el resto puede ser igual a un resto nucleotídico natural o puede ser diferente de un resto nucleotídico natural.

En otra clase relacionada de métodos de preparación de un ADN, se proporciona una mezcla de reacción que incluye un molde, un resto de inicio de la replicación que forma complejos con o está integrado en el molde, una polimerasa capaz de replicar al menos una parte del molde usando el resto en una reacción de prolongación por polimerasa dependiente de molde, y uno o más nucleótidos. De nuevo, el uno o más nucleótidos típicamente incluyen un análogo nucleotídico de fosfato marcado. La polimerasa en esta clase de realizaciones es homóloga a una ADN polimerasa $\Phi 29$. La polimerasa tiene una K_m para 488dC4P, A568dC4P o ambos, que es inferior a aproximadamente un 75 % de una K_m de una ADN polimerasa $\Phi 29$ GST-N62D para 488dC4P, A568dC4P o ambos.

Por ejemplo, la K_m para 488dC4P, A568dC4P puede ser aproximadamente un 40 % o menor que la ADN polimerasa $\Phi 29$ GST-N62D o, por ejemplo, aproximadamente un 15 % o menor. La mezcla se hace reaccionar de tal manera que la polimerasa replica al menos una parte del molde.

Las polimerasas usadas en los métodos pueden ser cualquiera de las indicadas anteriormente con referencia a las composiciones. Las propiedades de las polimerasas usadas en los métodos pueden ser cualquiera de las indicadas con referencia a las composiciones. Por ejemplo, la polimerasa opcionalmente tiene una k_{cat}/K_m para el análogo nucleotídico que es mayor que una k_{cat}/K_m de una $\Phi 29$ de tipo silvestre para el análogo nucleotídico. Asimismo, los análogos nucleotídicos usados en los métodos pueden ser cualquiera de los indicados con referencia a las composiciones de este documento. Las polimerasas recombinantes de este documento pueden tener una K_m para el análogo nucleotídico que es, por ejemplo, aproximadamente un 90 % tan elevada, aproximadamente un 80 % tan elevada, aproximadamente un 75 % tan elevada, aproximadamente un 60 % tan elevada, aproximadamente un 50 % tan elevada, aproximadamente un 40 % tan elevada, aproximadamente un 25 % tan elevada, aproximadamente un 15 % tan elevada, aproximadamente un 10 % tan elevada, o menos de aproximadamente un 5 % tan elevada como una K_m de una polimerasa de origen natural homóloga a la polimerasa recombinante. La polimerasa recombinante opcionalmente tiene una tasa aumentada de unión del análogo nucleotídico, una tasa aumentada de liberación de producto y/o una tasa disminuida de ramificación, en comparación con la polimerasa de tipo silvestre correspondiente.

Además de los métodos de uso de las composiciones de este documento, la presente invención también incluye métodos de preparación de las composiciones. Por ejemplo, en un aspecto, se proporciona un método de preparación de una ADN polimerasa recombinante (por ejemplo, cualquiera de las analizadas con respecto a las composiciones de este documento). Por ejemplo, los métodos pueden incluir el modelado estructural de una primera polimerasa, por ejemplo, usando cualquier estructura cristalina disponible y el software o sistema de modelado molecular. Basándose en el modelado, se identifica una o más características de inhibición estérica o características de complementariedad que afectan al acceso del nucleótido al sitio activo y/o la unión de un análogo nucleotídico dentro de la región de sitio activo, por ejemplo, en el sitio activo o próximo al mismo. La primera ADN polimerasa se muta para reducir o eliminar al menos una característica de inhibición estérica o para añadir la característica de complementariedad.

El método puede incluir adicionalmente cribado u otros protocolos para determinar si la polimerasa recombinante resultante presenta una actividad modificada para un análogo nucleotídico en comparación con la primera ADN polimerasa. Por ejemplo, puede determinarse la k_{cat} , K_m , V_{max} o k_{cat}/K_m de la ADN polimerasa recombinante para el análogo nucleotídico. Además, también puede determinarse la k_{cat} , K_m , V_{max} o k_{cat}/K_m de la ADN polimerasa recombinante para un nucleótido natural (por ejemplo, cuando la polimerasa incluye de forma deseada la actividad de incorporación de nucleótidos tanto análogos como naturales).

Puede prepararse una biblioteca de ADN polimerasas recombinantes y cribarse para estas propiedades. Por ejemplo, puede prepararse una pluralidad de miembros de la biblioteca para que incluyan una o más mutaciones de características de inhibición estérica y/o una mutación para producir complementariedad a una o más características no naturales del análogo nucleotídico, que entonces se criba para las propiedades de interés. En general, la biblioteca puede cribarse para identificar al menos un miembro que comprende una actividad modificada de interés.

En un aspecto adicional, la invención incluye métodos implementados por ordenador, por ejemplo, para modelar la cinética enzimática. Los métodos incluyen, por ejemplo, definir una pluralidad de transiciones de estado de la polimerasa para tramos de tiempo concretos durante una reacción de polimerización basada en molde; definir una pluralidad de tasas de transición de velocidad entre los estados; generar una matriz de probabilidades multidimensional de los posibles estados, basándose en una secuencia dada del molde de ácido nucleico, los nucleótidos en una mezcla de reacción y las transiciones de estado de la polimerasa; y, almacenar la matriz de probabilidades multidimensional en un medio legible por ordenador.

Una diversidad de características del método pueden variar. Por ejemplo, las transiciones de estado de la polimerasa opcionalmente son seleccionables por el usuario. Las tasas de transición de velocidad entre los estados opcionalmente varían dependiendo de la concentración de nucleótidos, la secuencia del molde y la posición de la polimerasa a lo largo del molde. Los nucleótidos en la mezcla de reacción opcionalmente comprenden uno o más análogos nucleotídicos. Las tasas de transición de velocidad entre los estados opcionalmente incluyen una tasa de transición conformacional para la polimerasa durante el uso de los análogos nucleotídicos por la polimerasa, con la tasa establecida igual a una tasa de transición conformacional para un nucleótido natural. La matriz de probabilidades multidimensional opcionalmente se genera automáticamente basándose en la secuencia del molde, una matriz normalizada de estados de probabilidad y los nucleótidos en la mezcla de reacción. La matriz de probabilidades opcionalmente se simplifica asumiendo que todos los posibles emparejamientos de bases de Watson-Crick son equivalentes en todas las transiciones de estado.

Asimismo, opcionalmente se genera una segunda matriz de concentración de reactivos para justifica los cambios de concentración de reactivos que se producen por la posición de la polimerasa a lo largo de un molde, basándose en un resultado de la matriz de probabilidades. La matriz de probabilidades opcionalmente se vectoriza para múltiples

moldes y la matriz de probabilidades vectorizada resultante puede multiplicarse por la matriz de probabilidades multidimensional para proporcionar una matriz de distribución de estados. Puede usarse un factor de tiempo exponencial para la matriz de probabilidades para justificar las secuencias repetidas dentro de la secuencia de molde. Puede definirse una fracción de emparejamientos incorrectos de nucleótidos por la polimerasa usando un modelo de continuidad o un modelo de recuento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa esquemáticamente un vector para la expresión de la ADN polimerasa Phi 29 N62D marcada.

La figura 2, panel A, presenta una alineación de secuencias para polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea los restos 505-525 (Phi29 SEQ ID NO:35, B103 SEQ ID NO:36, PZA SEQ ID NO:37, M2 SEQ ID NO:38, G1 SEQ ID NO:39, cp-1 SEQ ID NO:40). El panel B ilustra la estructura de Phi 29 con (parte superior) y sin (parte inferior) los restos 505-525. Se muestran la vistas de las estructuras desde tres ángulos diferentes.

La figura 3, panel A, presenta una alineación de secuencias para polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea E375 de Phi 29 (Phi29 SEQ ID NO:41, B103 SEQ ID NO:42, PZA SEQ ID NO:43, M2 SEQ ID NO:44, G1 SEQ ID NO:45, cp-1 SEQ ID NO:46). El panel B ilustra la estructura de Phi 29 (parte superior) y un mutante E375H (parte inferior). Se muestran la vistas de las estructuras desde tres ángulos diferentes.

La figura 4, panel A, presenta una alineación de secuencias para polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea E486 de Phi 29 (Phi29 SEQ ID NO:47, B103 SEQ ID NO:48, PZA SEQ ID NO:49, M2 SEQ ID NO:50, G1 SEQ ID NO:51, cp-1 SEQ ID NO:52). El panel B ilustra la estructura de Phi 29 (parte superior) y un mutante E486A (parte inferior). Se muestran la vistas de las estructuras desde tres ángulos diferentes.

La figura 5, panel A, muestra una alineación de secuencias para polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea K512 de Phi 29 (Phi29 SEQ ID NO:53, B103 SEQ ID NO:54, PZA SEQ ID NO:55, M2 SEQ ID NO:56, G1 SEQ ID NO:57, cp-1 SEQ ID NO:58). El panel B ilustra la estructura de Phi 29 (parte superior) y un mutante K512A (parte inferior). Se muestran la vistas de las estructuras desde tres ángulos diferentes.

La figura 6, panel A, muestra una alineación de secuencias para polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea K135 de Phi 29 (Phi29 SEQ ID NO:59, B103 SEQ ID NO:60, PZA SEQ ID NO:61, M2 SEQ ID NO:62, G1 SEQ ID NO:63, cp-1 SEQ ID NO:64). El panel B ilustra la estructura de Phi 29 (parte superior) y un mutante K135A (parte inferior). Se muestran la vistas de las estructuras desde tres ángulos diferentes.

La figura 7, panel A, ilustra esquemáticamente un ensayo de flujo detenido de FRET usado para determinar las tasas de unión y de liberación de producto. Los resultados del ensayo se muestran en los paneles B-D, para Phi29 N62D (panel B), N62D:E375Y (panel C) y N62D:E375W (panel D).

La figura 8, panel A, ilustra esquemáticamente un ensayo de flujo detenido de FRET usado para determinar la tasa de ramificación. Los resultados del ensayo se muestran en los paneles B-D, para Phi29 N62D (panel B), N62D:E375Y (panel C) y N62D:E375W (panel D).

La figura 9 representa un diagrama del tamaño de salto de la matriz cinética frente a la bajada de concentración.

Análisis detallado de la invención

Visión general

Una diversidad de tecnologías dependen de la incorporación de marcadores en ácidos nucleicos para observar los resultados de un experimento. Por ejemplo, el resultado de reacciones de secuenciación, de amplificación de ácido nucleico y de traslado de mella típicamente se controlan todas marcado los ácidos nucleicos producidos. Esto se hace, a menudo, uniéndose covalente o no covalentemente marcadores a los ácidos nucleicos producidos, por ejemplo, uniéndose sondas marcadas al ácido nucleico producido. En otras estrategias, se incorporan análogos nucleotídicos en los ácidos nucleicos producidos durante la síntesis del ácido nucleico producido. Esto típicamente sucede, por ejemplo, en la secuenciación por métodos de incorporación, y ciertas reacciones de PCR a tiempo real (RT-PCR) y LCR a tiempo real (RT-LCR). Puede incorporarse un marcador presente en el análogo en el ADN, o puede liberarse por la acción de la polimerasa. Puede controlarse la incorporación o liberación del marcador para controlar la incorporación de un resto análogo en el ácido nucleico producido.

La presente invención proporciona nuevas polimerasas que incorporan análogos nucleotídicos, tales como análogos marcados con fosfato marcado, en una copia de molde en crecimiento, durante la amplificación del ADN. Estas polimerasas se modifican de manera que el sitio activo de la polimerasa se modifique para reducir la inhibición estérica de la entrada del análogo en el sitio activo (que facilita la entrada del análogo nucleotídico en el sitio activo) y/o para proporcionar complementariedad a una o más características no naturales del análogo nucleotídico.

Estas nuevas polimerasas son particularmente muy adecuadas para aplicaciones de amplificación del ADN (por ejemplo, RT-PCR y RT-LCR) y/o de secuenciación, por ejemplo, en el contexto de protocolos de amplificación o secuenciación que incluyen la incorporación de análogos marcados en amplicones de ADN.

5 ADN polimerasas

Las ADN polimerasas que pueden modificarse para que interactúen con análogos nucleotídicos reduciendo la inhibición estérica de la entrada en el sitio activo, o añadiendo características complementarias a los análogos, están generalmente disponibles. Las ADN polimerasas se han clasificado, de forma relativamente reciente, en seis grupos principales basándose en diversas relaciones filogenéticas, por ejemplo, con Pol I de *E. coli* (clase A), Pol II de *E. coli* (clase B), Pol III de *E. coli* (clase B), Pol II euriarqueota (clase D), Pol beta humana (clase X) y UmuC/DinB de *E. coli* y RAD30 eucariota/variante de xerodermia pigmentosa (clase Y). Para una recapitulación de la nomenclatura reciente, véase, por ejemplo, Burgers et al. (2001) "Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature" J Biol Chem. 276(47):43487-90. Para una recapitulación de las polimerasas, véase, por ejemplo, Hübscher et al. (2002) EUKARYOTIC DNA POLYMERASES Annual Review of Biochemistry Vol. 71: 133-163; Alba (2001) "Protein Family Review: Replicative DNA Polymerases" Genome Biology 2(1): revisiones 3002.1-3002.4; y Steitz (1999) "DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms" J Biol Chem 274:17395-17398. Se han determinado los mecanismos básicos de acción para muchas polimerasas. Las secuencias de cientos de polimerasas, literalmente, están disponibles al público, y se han determinado las estructuras cristalinas de muchas de estas, o pueden deducirse basándose en la similitud con estructuras cristalinas resueltas para polimerasas homólogas. Por ejemplo, está disponible la estructura cristalina de $\Phi 29$.

También se han modificado enzimas ADN polimerasas disponibles de cualquiera de una diversidad de maneras, por ejemplo, para reducir o eliminar actividades exonucleasa (muchas ADN polimerasas nativas tienen una función exonucleasa de corrección de errores que interfiere con, por ejemplo, aplicaciones de secuenciación), para simplificar la producción generando fragmentos de enzima digeridos con proteasa tales como el fragmento Klenow recombinante, etc. Cualquiera de estas polimerasas disponibles puede modificarse de acuerdo con la invención para reducir la inhibición estérica de la entrada del análogo en el sitio activo, o para proporcionar características complementarias al análogo. Muchas de estas polimerasas que son adecuadas para su modificación están disponibles, por ejemplo, para su uso en tecnologías de secuenciación, marcaje y amplificación. Por ejemplo, la ADN polimerasa Beta humana está disponible en R&D systems. La ADN polimerasa I está disponible en Epicenter, GE Health Care, Invitrogen, New England Biolabs, Promega, Roche Applied Science, Sigma Aldrich y muchos otros. El fragmento Klenow de la ADN polimerasa I está disponible en versiones tanto recombinantes como diferidas por proteasa, en, por ejemplo, Ambion, Chimerx, eEnzyme LLC, GE Health Care, Invitrogen, New England Biolabs, Promega, Roche Applied Science, Sigma Aldrich y muchos otros. La ADN polimerasa $\Phi 29$ están disponible en, por ejemplo, Epicenter. La polimerasa Poli A, la transcriptasa inversa, la secunasa, la ADN polimerasa SP6, la ADN polimerasa T4, la ADN polimerasa T7 y una diversidad de ADN polimerasas termoestables (Taq, inicio caliente, Taq titanio, etc.) están disponible en una diversidad de estas y otras fuentes. Las recientes ADN polimerasas comerciales incluyen la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion™ que está disponible en New England Biolabs; la ADN polimerasa Flexi GoTaq® disponible en Promega; la ADN polimerasa $\Phi 29$ RepliPHI™ de EPICENTRE; la ADN polimerasa de inicio caliente PfuUltra™ disponible en Stratagene; la ADN polimerasa HiFi KOD que está disponible en Novagen y muchas otras. Biocompare(punto)com proporciona comparaciones de muchas polimerasas diferentes disponibles en el mercado.

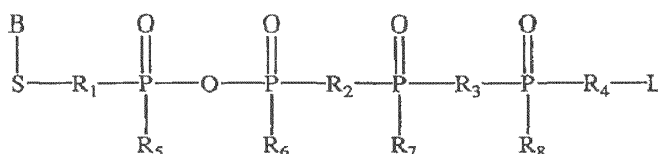
Las ADN polimerasas que son sustratos preferidos para mutación para reducir la inhibición estérica o para incorporar características complementarias al análogo nucleotídico incluyen polimerasas Taq, polimerasas Taq de actividad exonucleasa defectuosa, ADN polimerasa 1 de *E. coli*, fragmento Klenow, transcriptasas inversas, polimerasas relacionadas con $\Phi 29$ incluyendo derivados de la polimerasa $\Phi 29$ de tipo silvestre de dichas polimerasas tales como formas de actividad exonucleasa defectuosa, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T5, una polimerasa RB69, etc. Por ejemplo, la ADN polimerasa recombinante puede ser homóloga a una ADN polimerasa $\Phi 29$ de tipo silvestre o de actividad exonucleasa defectuosa, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.001.050, 5.198.543 o 5.576.204. Asimismo, la ADN polimerasa recombinante puede ser homóloga a $\Phi 29$, B103, GA-1, PZA, $\Phi 15$, BS32, M2Y, Nf, G1, Cp-1, PRD1, PZE, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722 o L17, o similares.

55 Análogos nucleotídicos

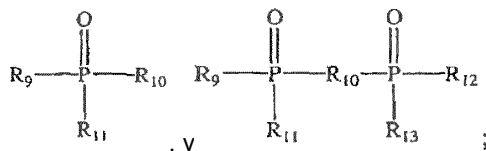
Como se analiza, diversas polimerasas de la invención pueden incorporar uno o más análogos nucleotídicos en una cadena oligonucleotídica en crecimiento. Tras la incorporación, el análogo puede dejar un resto que es igual a o diferente de un nucleótido natural en el oligonucleótido en crecimiento (la polimerasa puede incorporar cualquier motivo no convencional del análogo, o puede eliminarlo por escisión durante la incorporación en el oligonucleótido). Un "análogo nucleotídico", en este documento, es un compuesto que, en una aplicación particular, funciona de una manera similar o análoga a un nucleósido trifosfato (un "nucleótido") de origen natural, y que por lo demás no indica ninguna estructura particular. Un análogo nucleotídico es un análogo diferente de un nucleótido de origen natural convencional, es decir, diferente de A, G, C, T o U, aunque tras la incorporación en el oligonucleótido, el resto resultante en el oligonucleótido puede ser igual a (o diferente de) un resto de A, G, C, T o U.

Están disponibles muchos análogos nucleotídicos. Estos incluyen estructuras análogas con similitud central a nucleótidos de origen natural, tales como los que comprenden uno o más sustituyentes en un resto de fosfato, azúcar o base del nucleósido o nucleótido respecto a un nucleósido o nucleótido de origen natural. En una realización, un análogo nucleotídico puede incluir uno o más grupos adicionales que contienen fosfato, respecto a un nucleósido trifosfato. Por ejemplo, una diversidad de análogos nucleotídicos que comprenden, por ejemplo, 4-6 fosfatos se describen en detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/241.809, presentada el 29 de septiembre de 2005.

Por ejemplo, el análogo puede incluir un compuesto marcado de fórmula:



en la que B es una nucleobase (y opcionalmente incluye un marcador); S se selecciona de un resto de azúcar, un resto ácido o un resto carbocíclico (y opcionalmente incluye un marcador); L es un marcador detectable opcional; R₁ se selecciona de O y S; R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de O, NH, S, metileno, metileno sustituido, C(O), C(CH₂), CNH₂, CH₂CH₂, C(OH)CH₂R en el que R es 4-piridina o 1-imidazol, con la condición de que R₄ pueda seleccionarse adicionalmente de



R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₁ y R₁₃, cuando están presentes, se seleccionan cada uno independientemente de O, BH₃ y S; y R₉, R₁₀ y R₁₂ se seleccionan independientemente de O, NH, S, metileno, metileno sustituido, CNH₂, CH₂CH₂, C(OH)CH₂R en el que R es 4-piridina o 1-imidazol. En algunos casos, pueden emplearse análogos fosfonato como análogos, por ejemplo, en los que uno de R₂, R₃, R₄, R₉, R₁₀ o R₁₂ no son O, por ejemplo, son metilo, etc. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/241.809.

El resto de base incorporado en el análogo generalmente se selecciona de cualquiera de las nucleobases naturales o no naturales o análogos de nucleobase, incluyendo, por ejemplo, bases de purina o pirimidina que se encuentran de forma rutinaria en ácidos nucleicos y análogos de ácido nucleico disponibles, incluyendo adenina, timina, guanina, citidina, uracilo y, en algunos casos, inosina. Como se indica, la base opcionalmente incluye un resto marcador. Por comodidad, los nucleótidos y análogos nucleotídicos generalmente se mencionan basándose en su analogía relativa a nucleótidos de origen natural. Por tanto, un análogo que funciona, funcionalmente, como adenosina trifosfato, puede mencionarse generalmente en este documento por la abreviatura de letra A. Asimismo, pueden usarse las abreviaturas convencionales de T, G, C, U e I, en referencia a análogos de nucleósidos y nucleótidos de origen natural típicamente abreviados de la misma manera. En algunos casos, una base puede funcionar de una manera más universal, por ejemplo, funcionando como cualquiera de las bases de purina que son capaces de hibridar con cualquier base de pirimidina, o viceversa. Los restos de base usados en la presente invención pueden incluir las bases convencionales descritas en este documento o pueden incluir dichas bases sustituidas en uno o más grupos laterales, u otras bases fluorescentes o análogos de base, tales como 1,N6 etenoadenosina o pirrolo C, en que una estructura anular adicional hace que el grupo B no sea una purina ni una pirimidina. Por ejemplo, en determinados casos, puede ser deseable sustituir uno o más grupos laterales del resto de base con un grupo de marcaje o un componente de un grupo de marcaje, tal como uno de un fluoróforo donante o aceptor, u otro grupo de marcaje. Se describen ejemplos de nucleobases marcadas y procesos para marcar dichos grupos en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.328.824 y 5.476.928.

En los análogos, el grupo S es opcionalmente un resto de azúcar que proporciona una estructura adecuada para una hebra de ácido nucleico en síntesis. Por ejemplo, el resto de azúcar se selecciona opcionalmente de restos *D*-ribosilo, 2' o 3' *D*-desoxirribosilo, 2',3'-*D*-didesoxirribosilo, 2', 3'-*D*-dideshidrodidesoxirribosilo, 2' o 3' alcóxirribosilo, 2' o 3' aminorribosilo, 2' o 3' mercaptorribosilo, 2' o 3' alcotiorribosilo, acíclicos, carbocíclicos u otros restos de azúcar modificados. Puede incorporarse una diversidad de restos carbocíclicos o acíclicos como el grupo "S" en lugar de un resto de azúcar, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada n.º 2003/0124576, anteriormente incorporada en este documento por referencia en su totalidad a todos los fines.

Para la mayoría de los casos, la cadena que contiene fósforo en los análogos, por ejemplo, un trifosfato en NTP convencionales, se acopla preferentemente al grupo hidroxilo 5', como en nucleósidos trifosfato naturales. Sin embargo, en algunos casos, la cadena que contiene fósforo se une al grupo S por el grupo hidroxilo 3'.

L generalmente se refiere a un grupo de marcaje detectable que se acopla al átomo de fósforo terminal mediante el grupo R₄ (o R₁₀ o R₁₂). Los grupos de marcaje empleados en los análogos de la invención pueden comprender cualquiera de una diversidad de marcadores detectables. Los marcadores detectables generalmente indican un resto químico que proporciona una base para la detección del compuesto análogo diferente y distinto del mismo compuesto que carece de dicho grupo de marcaje. Los ejemplos de marcadores incluyen, por ejemplo, marcadores ópticos, por ejemplo, marcadores que confieren una propiedad óptica detectable al análogo, marcadores electroquímicos, por ejemplo, marcadores que confieren una propiedad eléctrica o electroquímica detectable al análogo, marcadores físicos, por ejemplo, marcadores que confieren una propiedad física o espacial diferente al análogo, por ejemplo, una marca de masa o marca de volumen molecular. En algunos casos, pueden usarse marcadores individuales o combinaciones que confieren más de una de las propiedades mencionadas anteriormente a los análogos de la invención.

Opcionalmente, los grupos de marcaje incorporados en los análogos comprenden restos detectables ópticamente, tales como restos luminiscentes, quimioluminiscentes, fluorescentes, fluorogénicos, cromofóricos y/o cromogénicos, siendo preferidos los marcadores fluorescentes y/o fluorogénicos. Se emplea fácilmente una diversidad de restos marcadores diferentes en los análogos nucleotídicos. Dichos grupos incluyen marcadores de fluoresceína, marcadores de rodamina, marcadores de cianina (es decir, Cy3, Cy5 y similares, generalmente disponible en la división Amersham Biosciences de GE Healthcare), la familia Alexa de colorantes fluorescentes y otros colorantes fluorescentes y fluorogénicos disponibles en Molecular Probes/Invitrogen, Inc., y descritos en 'The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, décima edición' (2005) (disponibles en Invitrogen, Inc./Molecular Probes). Se describe una diversidad de otros marcadores fluorescentes y fluorogénicos para su uso con nucleósidos polifosfato, y que serían aplicables a los análogos nucleotídicos incorporados por las polimerasas de la presente invención en, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos publicada n.º 2003/0124576, cuya divulgación completa se incorpora en este documento en su totalidad a todos los fines.

Pueden encontrarse detalles adicionales respecto a los análogos y los métodos de preparación de dichos análogos en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/241.809, presentada el 29 de septiembre de 2005 e incorporada en este documento por referencia en su totalidad a todos los fines.

Por tanto, en un ejemplo ilustrativo, el análogos puede ser un análogo de fosfato (por ejemplo, un análogo que tiene una cantidad de fosfatos mayor de la típica encontrada en nucleósidos trifosfato) que incluyen, por ejemplo, un marcador de colorante Alexa. Por ejemplo, un colorante Alexa488 puede usarse como marcador en un fosfato delta (indicado, por ejemplo, A488dC4P), o puede usarse un colorante Alexa568 o Alexa633 (por ejemplo, A568dC4P y A633dC4P, respectivamente), o puede usarse un colorante Alexa546 (por ejemplo, A546dG4P), o puede usarse un colorante Alexa594 (por ejemplo, A594dT4P). Asimismo, para facilitar la separación de colores, puede usarse como marcador un par de fluoróforos que muestran FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) en un fosfato delta de un análogo tetrafosfato (indicado, por ejemplo, FAM-amb-A532dG4P o FAM-amb-A594dT4P).

Modificación de ADN polimerasas para reducir las características de impedancia estérica y/o para añadir características de complementariedad

Diseño basado en la estructura de polimerasas recombinantes

Los datos estructurales para una polimerasa pueden usarse para identificar convenientemente restos aminoácidos como candidatos para mutagénesis para crear polimerasas recombinantes que tengan regiones de sitio activo modificadas. Por ejemplo, el análisis de la estructura tridimensional de una polimerasa puede identificar restos que impiden estéricamente el acceso al sitio activo por un nucleótido natural o análogo nucleotídico o análogo del mismo o que puede mutarse para introducir una característica complementaria a una característica no natural del análogo, por ejemplo, añadiendo o alterando la carga, la hidrofobicidad, el tamaño o similares.

Se han determinado las estructuras tridimensionales de una gran cantidad de ADN polimerasas por cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo las estructuras de polimerasas con moldes unidos, nucleótidos y/o análogos nucleotídicos. Muchas de estas estructuras están disponibles gratuitamente para su descarga del Protein Data Bank, en ([www\(punto\)rcsb\(punto\)org/pdb](http://www.pdb.org/pdb)). Las estructuras, junto con la información de dominios y homología, también están disponibles gratuitamente para su búsqueda y descarga del National Center for Biotechnology Information's Molecular Modeling DataBase, en ([www\(punto\)ncbi\(punto\)nml\(punto\)nih\(punto\)gov/Structure/MMDB/mmdb\(punto\)shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml)). Las estructuras de polimerasas adicionales pueden modelarse, por ejemplo, basándose en la homología de las polimerasas con polimerasas cuyas estructuras ya se han determinado. Como alternativa, puede determinarse la estructura de una polimerasa dada, opcionalmente en complejo con un análogo nucleotídico, o similar.

También son muy conocidas las técnicas de determinación de la estructura cristalina. Véase, por ejemplo, McPherson (1999) Crystallization of Biological Macromolecules Cold Spring Harbor Laboratory; Bergfors (1999) Protein Crystallization International University Line; Mullin (1993) Crystallization Butterworth-Heinemann; Stout y Jensen (1989) X-ray structure determination: a practical guide, 2.^a edición Wiley Publishers, Nueva York; Ladd y Palmer (1993) Structure determination by X-ray crystallography, 3.^a edición Plenum Press, Nueva York; Blundell y

Johnson (1976) *Protein Crystallography* Academic Press, Nueva York; Glusker y Trueblood (1985) *Crystal structure analysis: A primer*, 2.^a Ed. Oxford University Press, Nueva York; International Tables for Crystallography, Vol. F. *Crystallography of Biological Macromolecules*; McPherson (2002) *Introduction to Macromolecular Crystallography* Wiley-Liss; McRee y David (1999) *Practical Protein Crystallography*, segunda edición Academic Press; Drenth (1999) *Principles of Protein X-Ray Crystallography* (Springer Advanced Texts in Chemistry) Springer-Verlag; Fanchon y Hendrickson (1991) capítulo 15 de *Crystallographic Computing*, Volumen 5 IUCr/Oxford University Press; Murthy (1996) capítulo 5 de *Crystallographic Methods and Protocols* Humana Press; Dauter et al. (2000) "Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides" *Acta Cryst.*D56:232-237; Dauter (2002) "New approaches to high-throughput phasing" *Curr. Opin. Structural Biol.* 12:674-678; Chen et al. (1991) "Crystal structure of a bovine neurophysin-II dipeptide complex at 2.8 Å determined from the single-wavelength anomalous scattering signal of an incorporated iodine atom" *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88:4240-4244; y Gavira et al. (2002) "Ab initio crystallographic structure determination of insulin from protein to electron density without crystal handling" *Acta Cryst.*D58:1147-1154.

Además, está disponible al público una diversidad de programas para facilitar la recogida de datos, la determinación de fase, la construcción y refinado del modelo, y similares. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, el paquete HKL2000 (Otwinowski y Minor (1997) "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode" *Methods in Enzymology* 276:307-326), el paquete CCP4 (Collaborative Computational Project (1994) "The CCP4 suite: programs for protein crystallography" *Acta Crystallogr D* 50:760-763), SOLVE y RESOLVE (Terwilliger y Berendzen (1999) *Acta Crystallogr D* 55 (Pt 4):849-861), SHELXS y SHELXD (Schneider y Sheldrick (2002) "Substructure solution with SHELXD" *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58:1772-1779), Refmac5 (Murshudov et al. (1997) "Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method" *Acta Crystallogr D* 53:240-255), PRODRG (van Aalten et al. (1996) "PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules" *J Comput Aided Mol Des* 10:255-262), y O (Jones et al. (1991) "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models" *Acta Crystallogr A* 47 (Pt 2): 110-119).

Asimismo, las técnicas para la determinación de la estructura por espectroscopia de RMN están bien descritas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Cavanagh et al. (1995) *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Academic Press; Levitt (2001) *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons; Evans (1995) *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press; Wüthrich (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (Baker Lecture Series), Kurt Wiley-Interscience; Neuhaus y Williamson (2000) *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 2.^a edición, Wiley-VCH; Macomber (1998) *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, Wiley-Interscience; Downing (2004) *Protein NMR Techniques* (Methods in Molecular Biology), 2.^a edición, Humana Press; Clore y Gronenborn (1994) *NMR of Proteins* (Topics in Molecular and Structural Biology), CRC Press; Reid (1997) *Protein NMR Techniques*, Humana Press; Krishna y Berliner (2003) *Protein NMR for the Millenium* (Biological Magnetic Resonance), Kluwer Academic Publishers; Kiihne y De Groot (2001) *Perspectives on Solid State NMR in Biology* (Focus on Structural Biology, 1), Kluwer Academic Publishers; Jones et al. (1993) *Spectroscopic Methods and Analyses: NMR, Mass Spectrometry, and Related Techniques* (Methods in Molecular Biology, Vol. 17), Humana Press; Goto y Kay (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:585; Gardner (1998) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:357; Wüthrich (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:3340; Bax (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:738; Pervushin et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12366; Fiaux et al. (2002) *Nature* 418:207; Fernández y Wider (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:570; Ellman et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:7959; Wider (2000) *BioTechniques* 29:1278-1294; Pellecchia et al. (2002) *Nature Rev. Drug Discov.* (2002) 1:211-219; Arora y Tamm (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:540-547; Flaux et al. (2002) *Nature* 418:207-211; Pellecchia et al. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123:4633-4634; y Pervushin et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12366-12371.

La estructura de una polimerasa con un análogo nucleotídico dado incorporado en el sitio activo, según se indica, puede determinarse directamente, por ejemplo, por cristalografía de rayos X o espectroscopia de RMN, o la estructura puede modelarse basándose en la estructura de la polimerasa y/o una estructura de una polimerasa con un nucleótido natural unido. La región de sitio activo de la polimerasa puede identificarse, por ejemplo, por homología con otras polimerasas, examen de los complejos conjuntos de polimerasa-molde o polimerasa-nucleótido, análisis bioquímicos de polimerasas mutantes y/o similares. La posición de un análogo nucleotídico en el sitio activo puede modelarse, por ejemplo, proyectando la localización de características no naturales del análogo (por ejemplo, grupos fosfato o fosfonato adicionales en la cadena que contiene fósforo unida al nucleótido, por ejemplo, grupos tetra, penta o hexafosfato, grupos de marcaje detectables, por ejemplo, colorantes fluorescentes o similares) basándose en la localización determinada previamente de otro nucleótido o análogo nucleotídico en el sitio activo.

Dicho modelado del análogo nucleotídico en el sitio activo puede implicar la simple inspección visual de un modelo de la polimerasa, por ejemplo, usando un software de gráficos moleculares tales como el visor PyMOL (fuente libre, disponible gratuitamente en Internet en [www\(punto\)pymol\(punto\)org](http://www(punto)pymol(punto)org)) o Insight II (disponible en el mercado en Accelrys en [www\(punto\)accelrys\(punto\)com/products/insight](http://www(punto)accelrys(punto)com/products/insight)). Como alternativa, el modelado del análogo nucleotídico en el sitio activo de la polimerasa o una polimerasa mutante putativa, por ejemplo, puede implicar el acoplamiento asistido por ordenador, la dinámica molecular, la minimización de energía libre y/o cálculos similares. Dichas técnicas de modelado se han descrito bien en la bibliografía; véase, por ejemplo, Babine y Abdel-Meguid (eds.) (2004) *Protein Crystallography in Drug Design*, Wiley-VCH, Weinheim; Lyne (2002) "Structure-based virtual

screening: An overview" Drug Discov. Today 7:1047-1055; Molecular Modeling for Beginners, en (www(punto)usm(punto)maine(punto)edu/~rhodes/SPVTut/index(punto)html; y Methods for Protein Simulations and Drug Design en (www(punto)dddc(punto)ac(punto)cn/embo04; y referencias en los mismos. El software para facilitar dicho modelado está ampliamente disponible, por ejemplo, el paquete de simulación CHARMM, disponible académicamente en la Universidad de Harvard o en el mercado en Accelrys (en www(punto)accelrys(punto)com), el paquete de simulación Discover (incluido en Insight II, *supra*) y Dynama (disponible en (www(punto)cs(punto)gsu(punto)edu/~cscrwh/progs/progs(punto)html). Véase también una amplia lista de software de modelado en (www(punto)netsci(punto)org/Resources/Software/Modeling/MMMD/top(punto)html).

La inspección visual y/o el análisis en ordenador de un modelo de polimerasa puede identificar las características relevantes de la región de sitio activo, incluyendo, por ejemplo, restos que pueden inhibir estéricamente la entrada de un análogo nucleotídico en el sitio activo (por ejemplo, restos indeseablemente cercanos a la localización proyectada de uno o más átomos dentro del análogo cuando el análogo está unido a la polimerasa). Dicho resto, por ejemplo, puede eliminarse o remplazarse con un resto que tiene una cadena lateral más pequeña; por ejemplo, muchos restos pueden remplazarse convenientemente con un resto que tenga características similares, pero una cadena lateral del aminoácido más corta o, por ejemplo, con alanina. Asimismo, pueden identificarse los restos que pueden alterarse para introducir interacciones deseables con el análogo nucleotídico. Dicho resto puede remplazarse con un resto que sea complementario a una característica no natural del análogo, por ejemplo, con un resto que puede estar unido por hidrógeno al análogo (por ejemplo, serina, treonina, histidina, asparagina o glutamina), un resto hidrófobo que puede interactuar con un grupo hidrófobo en el análogo, un resto aromático que puede proporcionar interacciones hidrófobas favorables con un grupo en el análogo (por ejemplo, un fluoróforo), un resto aromático que puede acoplar en una interacción π - π o de apilamiento de borde-superficie con un grupo aromático en el análogo, un resto que puede acoplar en una interacción catión- π con el análogo, o un resto cargado (por ejemplo, ácido aspártico o glutámico, o lisina, arginina o histidina) que puede interactuar de forma electrostática con un resto de carga opuesta en el análogo (por ejemplo, un grupo fosfato adicional).

Únicamente como un ejemplo específico de dicho diseño basado en estructura, la inspección de un modelo de la polimerasa Φ 29 identificó el dominio Δ 505-525 y los restos K135, E486 y K512 como inhibidores estéricos potenciales de la entrada de un análogo en el sitio activo, y sugirió que la mutación de E375 en histidina, lisina o arginina introduciría una carga positiva complementaria a un tetrafosfato no natural en el análogo. Asimismo, la inspección del modelo sugirió que la mutación de E375 en un resto aromático tal como triptófano, tirosina o fenilalanina mejoraría las interacciones hidrófobas con un fluoróforo en el análogo. Véanse los ejemplos 2 y 3 a continuación para detalles adicionales.

Por tanto, además de los métodos de uso de las polimerasas y otras composiciones de este documento, la presente invención también incluye métodos de preparación de las polimerasas. Como se describe, los métodos de preparación de una ADN polimerasa recombinante pueden incluir el modelado estructural de una primera polimerasa, por ejemplo, usando cualquier estructura cristalina disponible y el software o sistema de modelado molecular. Basándose en el modelado, se identifica una o más características de inhibición estérica o características de complementariedad que afectan al acceso del nucleótido al sitio activo y/o la unión de un análogo nucleotídico dentro de la región de sitio activo, por ejemplo, en el sitio activo o próximo al mismo. La primera ADN polimerasa se muta para reducir o eliminar al menos una característica de inhibición estérica o para añadir la característica de complementariedad.

Mutación de regiones de sitio activo

Diversos tipos de mutagénesis se usan opcionalmente en la presente invención, por ejemplo, para modificar las polimerasas para producir variantes que comprenden características de complementariedad y/o para reducir características de impedancia estérica, por ejemplo, de acuerdo con modelos de polimerasa y predicciones de modelos como se analiza anteriormente. En general, puede usarse cualquier procedimiento de mutagénesis disponible para generar dichos mutantes. Dichos procedimientos de mutagénesis incluyen la sección de ácidos nucleicos mutantes y polipéptidos para una o más actividades de interés (por ejemplo, K_m , V_{max} , k_{cat} mejorada, etc., para un análogo nucleotídico). Los procedimientos que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación: mutagénesis puntual dirigida al sitio, mutagénesis puntual aleatoria, recombinación homóloga *in vitro* o *in vivo* (reordenamiento de ADN), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida por oligonucleótido, mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato, mutagénesis usando ADN dúplex con huecos, reparación de emparejamientos incorrectos puntuales, mutagénesis usando cepas hospedadoras de reparación defectuosa, selección de restricción y purificación de restricción, mutagénesis por eliminación, mutagénesis por síntesis génica total, PCR degenerada, reparación de roturas bicatenarias, y muchos otros conocidos para los expertos en la materia.

Opcionalmente, la mutagénesis puede estar guiada por información conocida de una molécula de polimerasa de origen natural, o de una polimerasa alterada o mutada conocida (por ejemplo, usando una polimerasa mutante existente que presenta actividad exonucleasa reducida), por ejemplo, la secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina y/o similares como se analiza anteriormente. Sin embargo, en otra clase de realizaciones, la modificación puede ser esencialmente aleatoria (por ejemplo, como en reordenamiento clásico de ADN).

Se encuentra información adicional sobre formatos de mutación en: Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3.^a Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 ("Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, un proyecto conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado hasta 2006) ("Ausubel") y PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis). Las siguientes publicaciones y referencias citadas en los mismos proporcionan más detalles adicionales sobre formatos de mutación: Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, Science 242:240-245 (1988); Botstein y Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, Science 229:1193-1201(1985); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, Biochem. J. 237:1-7 (1986); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, Methods in Enzymol. 154: 382-403 (1987); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, Methods Mol. Biol. 57:369-374 (1996); Eghtedarzadeh y Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14: 5115 (1986); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic redactions *in vitro*, Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999 (1988); Grundström et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316 (1985); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlín) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Methods in Enzymol. 154, 367-382 (1987); Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, Methods in Enzymol. 154:350-367 (1987); Kramer et al., Point Mismatch Repair, Cell 38:879-887 (1984); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl. Acids Res. 16: 7207 (1988); Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, Anal Biochem. 254(2): 157-178 (1997); Lorimer and Pastan Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181 (1986); Nakamaye y Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); Sakamar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372 (1988); Sayers et al., Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) Nucl. Acids Res. 16: 803-814; Sieber, et al., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); Smith, *In vitro* mutagenesis, Ann. Rev. Genet. 19:423-462(1985); Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423 (1986); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, Nucleic Acids Res. 10:6487-6500 (1982); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, Methods in Enzymol. 100:468-500 (1983); yZoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple methods using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, Methods in Enzymol. 154:329-350 (1987). Pueden encontrarse detalles adicionales sobre muchos de los métodos anteriores en Methods in Enzymology Volumen 154, que también describe controles útiles para resolver problemas con diversos métodos de mutagénesis.

Determinación de parámetros cinéticos

Las polimerasas de la invención pueden cribarse o ensayarse de otro modo para determinar si la polimerasa presenta una actividad modificada para o con un análogo nucleotídico en comparación con la primera ADN polimerasa (por ejemplo, una polimerasa de tipo silvestre correspondiente de la que se obtuvo la polimerasa recombinante). Por ejemplo, puede determinarse la k_{cat} , K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m , V_{max}/K_m , k_{pol} y/o K_d de la ADN polimerasa recombinante para el análogo nucleotídico. Además, también puede determinarse la k_{cat} , K_m , V_{max} , V_{max}/K_m , k_{cat}/K_m , k_{pol} y/o K_d de la ADN polimerasa recombinante para un nucleótido natural (por ejemplo, cuando la polimerasa incluye de forma deseada la actividad de incorporación de nucleótidos tanto análogos como naturales).

Como es bien sabido en la técnica, para enzimas que cumple la cinética simple de Michaelis-Menten, los parámetros cinéticos se obtienen fácilmente de las tasas de catálisis medidas a diferentes concentraciones de sustrato. La ecuación de Michaelis-Menten, $V = V_{max}[S]/([S]+K_m)^{-1}$, se refiere a la concentración de sustrato no combinado ($[S]$, aproximada por la concentración de sustrato total), la tasa máxima (V_{max} , obtenida cuando la enzima se satura con

sustrato) y la constante de Michaelis (K_m , igual a la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es la mitad de su valor máximo), para la velocidad de reacción (V).

Para muchas enzimas, la K_m es igual a la constante de disociación del complejo de enzima-sustrato y es, por tanto, una medida de la resistencia del complejo de enzima-sustrato. Para dicha enzima, en una comparación de K_m s, una K_m inferior representa un complejo con unión más fuerte, mientras que una K_m mayor representa un complejo con unión más débil. La relación k_{cat}/K_m , a veces llamada la constante de especificidad, representa la constante de velocidad aparente para la combinación de sustrato con enzima libre. Cuanto mayor sea la constante de especificidad, más eficaz será la enzima en la unión al sustrato y su conversión en producto.

La k_{cat} (también llamada el número de recambio de la enzima) puede determinarse si la concentración de enzima total ($[E_T]$, es decir, la concentración de sitios activos) es conocida, ya que $V_{max} = k_{cat}[E_T]$. Para situaciones en las que la concentración de enzima total es difícil de medir, a menudo se usa la relación V_{max}/K_m en su lugar como una medida de la eficacia. La K_m y la V_{max} pueden determinarse, por ejemplo, a partir de un diagrama de Lineweaver-Burk de $1/V$ frente a $1/[S]$, en el que la ordenada en el origen representa $1/V_{max}$, la abscisa en el origen $-1/K_m$ y la pendiente K_m/V_{max} , o a partir de un diagrama de Eadie-Hofstee de V frente a $V/[S]$, en el que la ordenada en el origen representa V_{max} , la abscisa en el origen V_{max}/K_m y la pendiente $-K_m$. Los paquetes de software, tales como KinetAsyst™ o Enzfyt (Biosoft, Cambridge, R.U.) pueden facilitar la determinación de los parámetros cinéticos a partir de datos de tasas catalíticas.

Para enzimas tales como polimerasas que tienen múltiples sustratos, variar la concentración de únicamente un sustrato mientras se mantienen los otros en una concentración en exceso adecuada (por ejemplo, realmente constante) típicamente produce una cinética normal de Michaelis-Menten.

En una realización, usando una cinética previa al estado estacionario, la dependencia en la concentración de nucleótidos de la tasa k_{obs} (la constante de velocidad de primer orden observada para la incorporación de dNTP) proporciona una estimación de la K_m para una unión en estado basal y la tasa máxima de polimerización (k_{pol}). La k_{obs} se mide usando un ensayo de descarga. Los resultados del ensayo se ajustan con la ecuación de descarga; Producto = $A[1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)] + k_{ss} \cdot t$ en la que A representa la amplitud y la estimación de la concentración de los sitios activos de la enzima, k_{ss} es la constante de velocidad en estado estacionario observada y t es el tiempo de incubación de reacción. La K_m para la unión de dNTP al complejo de polimerasa-ADN y la k_{pol} se calculan ajustando el cambio dependiente de la concentración de dNTP en la k_{obs} usando la ecuación $k_{obs} = (k_{pol} \cdot [S]) / (K_m + [S]) - 1$ en la que $[S]$ es la concentración de sustrato. Los resultados se obtienen opcionalmente de un experimento de inactivación rápida (también llamado una medición de flujo de inactivación), por ejemplo, basado en los métodos descritos en Johnson (1986) "Rapid kinetic analysis of mechanochemical adenosinetriphosphatases" *Methods Enzymol.* 134:677-705, Patel et al. (1991) "Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant" *Biochemistry* 30(2):511-25, y Tsai y Johnson (2006) "A new paradigm for DNA polymerase specificity" *Biochemistry* 45(32):9675-87.

Los parámetros tales como la tasa de unión de un análogo nucleotídico por la polimerasa recombinante, la tasa de liberación de producto por la polimerasa recombinante, o la tasa de ramificación de la polimerasa recombinante (la "tasa de ramificación" es la tasa de disociación de un nucleótido o análogo nucleotídico del sitio activo de la polimerasa sin incorporación del nucleótido o análogo nucleotídico, donde el nucleótido o análogo nucleotídico, si se incorporó, formaría pares de bases correctamente con un nucleótido o análogo nucleotídico complementario en el molde) también pueden determinarse y, opcionalmente, compararse con las de la primera polimerasa (por ejemplo, una polimerasa de tipo silvestre correspondiente). Véase, por ejemplo, el ejemplo 3 en este documento.

Para un análisis más minucioso de la cinética de las enzimas, véase, por ejemplo, Berg, Tymoczko, y Stryer (2002) *Biochemistry*, Quinta Edición, W. H. Freeman; Creighton (1984) *Proteins: Structures and Molecular Principle*, W. H. Freeman; y Fersht (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, Segunda edición, W. H. Freeman.

Como se analiza anteriormente, la ADN polimerasa relevante tiene una región de sitio activo modificada que es homóloga a una región de sitio activo de tipo silvestre de una ADN polimerasa de tipo silvestre, por ejemplo, que incluye una o más modificaciones estructurales respecto a la región de sitio activo de tipo silvestre que aumenta la actividad relativa de la enzima para uno o más de los nucleótidos naturales y/o análogos nucleotídicos, siendo los aumentos en la actividad para análogos nucleotídicos un objetivo preferido. En al menos un aspecto, sin comprometerse a teoría particular alguna de funcionamiento, las modificaciones están dirigidas a reducir la inhibición estérica para la entrada del análogo nucleotídico en el sitio activo modificado y/o que es complementario a una o más características no naturales del análogo nucleotídico. Un valor de K_m de la polimerasa recombinante para el análogo nucleotídico típicamente es inferior a una K_m para una polimerasa de tipo silvestre homóloga correspondiente para el análogo nucleotídico.

En un aspecto, la actividad mejorada de las enzimas de la invención se mide con referencia a un análogo o conjunto de análogos modelo y se compara con una enzima precursora dada. Por ejemplo, en el caso de enzimas derivadas de una enzima precursora $\Phi 29$, una enzima mejorada de la invención tendría una K_m inferior a la de la enzima precursora, por ejemplo, $\Phi 29$ de tipo silvestre o $\Phi 29$ N62D, hacia un análogo dado. En general, con fines analíticos,

los ejemplos de enzimas mejoradas de la invención se podrán caracterizar teniendo K_m inferiores hacia A488dC4P y/o A568dC4P, dos análogos que se han procesado razonablemente bien y se han procesado razonablemente mal por enzimas derivadas de $\Phi 29$, respectivamente, que son, por ejemplo, de aproximadamente un 5 % o menor a aproximadamente un 90 % o menor de la K_m poseída por $\Phi 29$ N62D hacia los mismos análogos. Por ejemplo, como se expone en más detalle en los ejemplos a continuación, por ejemplo, en la tabla 2, $\Phi 29$ His-375H-N62D presenta una K_m que es aproximadamente un 40 % de la K_m de $\Phi 29$ N62D para A488dC4P, mientras que $\Phi 29$ His-375S-N62D presenta una K_m que es aproximadamente un 75 % de la K_m de $\Phi 29$ N62D para A488dC4P. Asimismo, $\Phi 29$ His-375H-N62D presenta una K_m que es aproximadamente un 15 % de la K_m de $\Phi 29$ N62D para A568dC4P, mientras que $\Phi 29$ His-375S-N62D presenta una K_m que es aproximadamente un 38 % de la K_m de $\Phi 29$ N62D para A568dC4P. Aunque lo anterior puede usarse como herramienta de caracterización, no se pretende, de ninguna manera, como una reacción específicamente limitante de la invención.

Cribado de polimerasas

Puede usarse cribado u otros protocolos para determinar si una polimerasa presenta una actividad modificada para un análogo nucleotídico en comparación con la primera ADN polimerasa. Por ejemplo, puede determinarse la k_{cat} , K_m , V_{max} o k_{cat}/K_m de la ADN polimerasa recombinante para el análogo nucleotídico como se analiza anteriormente. Además, también puede determinarse la k_{cat} , K_m , V_{max} o k_{cat}/K_m de la ADN polimerasa recombinante para un nucleótido natural de forma similar (por ejemplo, cuando la polimerasa incluye de forma deseada la actividad de incorporación de nucleótidos tanto análogos como naturales).

En un aspecto deseable, puede prepararse una biblioteca de ADN polimerasas recombinantes y cribarse para estas propiedades. Por ejemplo, puede prepararse una pluralidad de miembros de la biblioteca para que incluyan una o más mutaciones de características de inhibición estérica putativas y/o una mutación para producir supuestamente complementariedad a una o más características no naturales del análogo nucleotídico, que entonces se criba para las propiedades de interés. En general, la biblioteca puede cribarse para identificar al menos un miembro que comprende una actividad modificada de interés.

Las bibliotecas de polimerasas pueden ser de naturaleza física o lógica. Además, puede usarse cualquiera de una amplia diversidad de formatos de biblioteca. Por ejemplo, las polimerasas pueden fijarse a superficies sólidas en matrices de proteínas. Asimismo, pueden construirse matrices en fase líquida de polimerasas (por ejemplo, en placas de micropocillos) para manipulaciones convenientes de líquidos de alto rendimiento de soluciones que comprenden polimerasas. También pueden construirse bibliotecas en fase líquida, de emulsión o de gel de células que expresan polimerasas recombinantes, por ejemplo, en placas de micropocillos, o en placas de agar. Pueden producirse bibliotecas de presentación en fagos de polimerasas o dominios polimerasa (por ejemplo, incluyendo la región de sitio activo). Las instrucciones sobre la preparación y uso de bibliotecas pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook, Ausubel y Berger, mencionados en este documento.

Para la generación de bibliotecas que implican la transferencia de líquidos a o desde placas de microvaloración, opcionalmente se usa una estación de manipulación de líquidos. Están disponibles en el mercado varias estaciones de manipulación de líquidos "existentes" para realizar dichas transferencias, incluyendo, por ejemplo, los sistemas Zymate de Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA) y otras estaciones que utilizan pipetas automatizadas, por ejemplo, junto con la robótica para el movimiento de las placas (por ejemplo, el robot ORCA®, que se usa en una diversidad de sistemas de laboratorio disponibles, por ejemplo, de Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA).

En una realización alternativa, la manipulación de líquidos se realiza en microchips, por ejemplo, que implican la transferencia de materiales de placas de micropocillos u otros pocillos a través de microcanales sobre los chips hasta los sitios de destino (regiones de microcanales, pocillos, cámaras o similares). Los sistemas de microfluidos disponibles en el mercado incluyen los de Hewlett-Packard/Agilent Technologies (por ejemplo, el bioanalizador HP2100) y el sistema de cribado de alto rendimiento Caliper. El sistema de cribado de alto rendimiento Caliper proporciona una interfaz ejemplar entre los formatos convencionales de bibliotecas en micropocillos y las tecnologías de chips de laboratorio. Además, los textos de patentes y técnicos incluye muchos ejemplos de sistemas de microfluidos que pueden interactuar directamente con placas de micropocillos para la manipulación de líquidos.

Propiedades deseables

Las polimerasas de la invención pueden incluir cualquiera de una diversidad de propiedades modificadas hacia nucleótidos naturales o análogos nucleotídicos o análogos, dependiendo de la aplicación, incluyendo velocidad aumentada, tiempo de retención aumentado (o velocidad disminuida) para las bases incorporadas, mayor capacidad de procesamiento, etc. Por ejemplo, cuando se desea un mayor nivel de incorporación de análogo nucleotídico, la polimerasa de la invención se selecciona para que tenga una K_m inferior, una V_{max} mayor y/o una k_{cat} mayor que una polimerasa de tipo silvestre homóloga correspondiente con respecto a un análogo nucleotídico dado. En ciertas realizaciones, es deseable ralentizar o acelerar la velocidad de incorporación global de nucleótidos de la polimerasa (por ejemplo, dependiendo de la resolución del equipo usado para controlar la incorporación), o para mejorar la capacidad de procesamiento, la especificidad o similares. En ciertas realizaciones, la polimerasa recombinante tiene una tasa aumentada de unión de un análogo nucleotídico, una tasa aumentada de liberación de producto y/o una

tasa disminuida de ramificación, en comparación con una polimerasa de tipo silvestre homóloga correspondiente. Cualquiera de estas características puede cribarse en la selección de una polimerasa de la invención.

Por ejemplo, las polimerasas de la invención típicamente pueden incorporar nucleótidos naturales (por ejemplo, A, C, G y T) en un ácido nucleico de copia en crecimiento. Por ejemplo, la polimerasa recombinante opcionalmente presenta una actividad específica para un nucleótido natural que es al menos aproximadamente un 5 % tan elevada (por ejemplo, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % o mayor) como una polimerasa de tipo silvestre homóloga correspondiente y una capacidad de procesamiento con nucleótidos naturales en presencia de un molde que es al menos un 5 % tan elevada (por ejemplo, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % o mayor) como la polimerasa de tipo silvestre en presencia del nucleótido natural. Opcionalmente, la polimerasa recombinante también presenta una k_{cat}/K_m o V_{max}/K_m para un nucleótido de origen natural que es al menos aproximadamente un 10 % tan elevada (por ejemplo, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 % o mayor) como la polimerasa de tipo silvestre.

Detalles ejemplares adicionales

En este documento se describen varios ejemplos específicos de regiones de sitio activo modificadas. Una "región de sitio activo" es una parte de la polimerasa que incluye o está próxima al sitio activo (por ejemplo, en aproximadamente 2 nm del sitio activo) en una estructura tridimensional de una polimerasa plegada. En este documento se describen ejemplos específicos de modificaciones estructurales dentro de o próximas al sitio activo de la ADN polimerasa $\Phi 29$. Por ejemplo, respecto a una ADN polimerasa $\Phi 29$ de tipo silvestre, estas modificaciones pueden incluir cualquiera de: una eliminación de $\Delta 505$ -525, una eliminación dentro del dominio $\Delta 505$ -525, una mutación K135A, una mutación L384R (por ejemplo, en combinación con otra mutación de este documento), una mutación E375H, una mutación E375S, una mutación E375K, una mutación E375R, una mutación E375A, una mutación E375Q, una mutación E375W, una mutación E375Y, una mutación E375F, una mutación E486A, una mutación E486D, una mutación K512A, una mutación enumerada en la tabla 8 y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, la polimerasa puede incluir una combinación de mutaciones seleccionadas de la lista de combinaciones de la tabla 8.

La polimerasa opcionalmente incluye además una o más mutaciones/eliminaciones respecto a la polimerasa de tipo silvestre que reducen o eliminan la actividad exonucleasa endógena. Por ejemplo, respecto a la ADN polimerasa $\Phi 29$ de tipo silvestre, N62 opcionalmente se muta o se elimina para reducir la actividad exonucleasa; por ejemplo, la polimerasa puede incluir una mutación N62D. Otras mutaciones ejemplares que reducen la actividad exonucleasa incluyen D12A, T15I, E14I y/o D66A; por consiguiente, las polimerasas de la invención opcionalmente comprenden una o más de estas mutaciones.

Como podrá apreciarse, la numeración de los restos aminoacídicos es con respecto a la secuencia de tipo silvestre de la polimerasa $\Phi 29$, y la posición real dentro de una molécula de la invención puede variar basándose en la naturaleza de las diversas modificaciones que la enzima incluye respecto a la enzima $\Phi 29$ de tipo silvestre, por ejemplo, eliminaciones y/o adicionales a la molécula, en los extremos o dentro de la propia molécula.

Marcas de afinidad y otras características opcionales de la polimerasa

La ADN polimerasa recombinante opcionalmente incluye características adicionales exógenas o heterólogas a la polimerasa. Por ejemplo, la polimerasa recombinante opcionalmente incluye una o más marcas de afinidad exógenas, por ejemplo, marcas de purificación o de unión a sustrato, tales como una secuencia de marca de 6 His, una marca GST, una secuencia de marca HA, una pluralidad de secuencias de marca de 6 His, una pluralidad de marcas GST, una pluralidad de secuencias de marca HA, una marca SNAP o similares. Estas y otras características útiles en el contexto de una unión de una polimerasa a una superficie se incluyen opcionalmente, por ejemplo, para orientar y/o proteger el sitio activo de la polimerasa cuando la polimerasa se une a una superficie. Otras características útiles incluyen dominios de dimerización recombinantes de la enzima y, por ejemplo, dominios polipeptídicos foráneos grandes acoplados a la polimerasa distantes del sitio activo. Por ejemplo, para $\Phi 29$, el sitio activo está en la región C-terminal de la proteína, y los elementos de unión superficial añadidos (dominios adicionales, marcas His, etc.) típicamente están localizados en la región N-terminal para evitar la interferencia con el sitio activo cuando la polimerasa se acopla a una superficie.

En general, los elementos de unión superficial y las marcas de purificación que pueden añadirse a la polimerasa (de forma recombinante o, por ejemplo, químicamente) incluyen, por ejemplo, marcas de polihistidina, marcas HIS-6, biotina, avidina, secuencias GST, secuencias BiTag, marcas S, marcas SNAP, sitios de enterocinasa, sitios de trombina, anticuerpos o dominios de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, antígenos, receptores, dominios de receptor, fragmentos de receptor, ligandos, colorantes, aceptores, inactivadores o combinaciones de los mismos.

Pueden añadirse múltiples dominios de unión superficial para orientar el polipéptido respecto a una superficie y/o para aumentar la unión de la polimerasa a la superficie. Uniendo una superficie a dos o más sitios, a través de dos o más marcas diferentes, la polimerasa se mantiene en una orientación relativamente fija con respecto a la superficie.

Se encuentran detalles adicionales sobre la fijación de una polimerasa a una superficie en la solicitud de patente de Estados Unidos 60/753.446 "PROTEIN ENGINEERING STRATEGIES TO OPTIMIZE ACTIVITY OF SURFACE ATTACHED PROTEINS" de Hanzel et al. y la solicitud de patente de Estados Unidos 60/753.515 "ACTIVE SURFACE COUPLED POLYMERISES" de Hanzel et al., ambas presentadas el 22 de diciembre de 2005 e incorporadas en este documento por referencia a todos los fines, y en el expediente del mandatario número 105-001210US "PROTEIN ENGINEERING STRATEGIES TO OPTIMIZE ACTIVITY OF SURFACE ATTACHED PROTEINS" de Hanzel et al. y el expediente del mandatario 105-00810US "ACTIVE SURFACE COUPLED POLYMERASES" de Hanzel et al. ambos presentados conjuntamente junto con la presente e incorporados en este documento por referencia a todos los fines.

Aplicaciones para la incorporación potenciada de análogos nucleotídicos por una ADN polimerasa

Las polimerasas de la invención, los nucleótidos naturales y/o los análogos nucleotídicos y los moldes de ácido nucleico (ADN o ARN) opcionalmente se usan para copiar el ácido nucleico molde. Es decir, una mezcla de la polimerasa, los análogos nucleotídicos y, opcionalmente, nucleótidos naturales y otros reactivos, el molde y un resto de inicio de la replicación se hace reaccionar de tal manera que la polimerasa prolonga el cebador de una manera dependiente del molde. El resto puede ser un cebador oligonucleotídico convencional o, como alternativa, un componente del molde, por ejemplo, el molde puede ser un ADN monocatenario de autocebado, un ADN bicatenario mellado o similares. Asimismo, una proteína terminal puede servir como resto iniciador. Puede incorporarse al menos un análogo nucleotídico en el ADN. El ADN molde puede ser ADN lineal o circular y, en ciertas aplicaciones, es deseable un molde circular (por ejemplo, para la replicación por círculo rodante o para la secuenciación de moldes circulares). Opcionalmente, la composición puede estar presente en un sistema automatizado de replicación y/o secuenciación de ADN.

La incorporación de análogos nucleotídicos marcados por las polimerasas de la invención son particularmente útiles en una diversidad de diferentes análisis de ácidos nucleicos, incluyendo el control a tiempo real de la polimerización del ADN. El propio marcador puede incorporarse, o más preferentemente, puede liberarse durante la incorporación. Por ejemplo, la incorporación de análogos puede controlarse a tiempo real controlando la liberación de marcador durante la incorporación del análogo por la polimerasa. La parte del análogo que se incorpora puede ser igual que un nucleótido natural, o puede incluir características del análogo que difieren de un nucleótido natural.

En general, la incorporación o liberación del marcador puede usarse para indicar la presencia y composición de una hebra de ácido nucleico en crecimiento, por ejemplo, proporcionando evidencias de la replicación/amplificación del molde y/o la secuencia del molde. La señalización procedente de la incorporación puede resultar de la detección de grupos de marcaje que se liberan del análogo incorporado, por ejemplo, en un ensayo en fase sólida, o puede surgir tras la reacción de incorporación. Por ejemplo, en el caso de marcadores de FRET en los que un marcador unido está inactivado y un marcador libre no, la liberación de un grupo marcador desde el análogo incorporado puede dar lugar a una señal fluorescente. Como alternativa, la enzima puede marcarse con un miembro de un par FRET próximo al sitio activo, y la incorporación de un análogo que alberga el otro miembro permitirá la transferencia de energía tras la incorporación. El uso de componentes FRET unidos a la enzima en aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada n.º 2003-0044781.

En una reacción ejemplar de interés, una reacción de polimerasa puede aislarse dentro del volumen de observación extremadamente pequeño que provoca realmente la observación de moléculas individuales de polimerasa. Como resultado, el evento de incorporación proporciona la observación de un análogo nucleotídico que se incorpora que es fácilmente distinguible de análogos nucleotídicos no incorporados. En un aspecto preferido, dichos volúmenes de observación pequeños se proporcionan inmovilizando la enzima polimerasa dentro de un confinamiento óptico, tal como un Zero Mode Waveguide. Para una descripción de los ZMW y su aplicación en análisis de moléculas individuales y, particularmente, secuenciación de ácidos nucleicos, véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos publicada n.º 2003/0044781, y la patente de Estados Unidos n.º 6.917.726.

En general, una enzima polimerasa forma complejos con la hebra molde en presencia de uno o más nucleótidos y/o uno o más análogos nucleotídicos de la invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, están presentes análogos marcados que representan compuestos análogos a cada uno de los cuatro nucleótidos natural, A, T, G y C, por ejemplo, en reacciones de polimerasa diferentes, como en la secuenciación clásica de Sanger, o combinadas juntas en una única reacción, como en estrategias de secuenciación combinada. Cuando la polimerasa encuentra una base particular en la hebra molde durante la reacción de polimerización, forma un complejo con un análogo disponible que es complementario a dicho nucleótido, e incorpora ese análogo en la hebra de ácido nucleico naciente y en crecimiento. En un aspecto, la incorporación puede provocar que el marcador se libere, por ejemplo, en análogos de polifosfato, escindiendo entre los átomos a y de fósforo en el análogo y, por consiguiente, liberando el grupo de marcaje (o una parte del mismo). El evento de incorporación se detecta, en virtud de una presencia más larga del análogo y, por tanto, el marcador, en el complejo, o en virtud de la liberación del grupo marcador en el medio adyacente. Cuando se usan diferentes grupos de marcaje para cada uno de los tipos de análogos, por ejemplo, A, T, G o C, la identificación de un marcador de un análogo incorporado permite la identificación de ese análogo y, por consiguiente, la determinación del nucleótido complementario en la hebra molde que se está procesando en ese momento. La reacción y el control secuenciales permiten un control a tiempo real de la reacción

de polimerización y la determinación de la secuencia del ácido nucleico molde. Como se indica anteriormente, en aspectos particularmente preferidos, el complejo de enzima polimerasa/molde se proporciona inmovilizado dentro de un confinamiento óptico que permite la observación de un complejo individual, por ejemplo, un Zero Mode Waveguide. Además de su uso en la secuenciación, los análogos de la invención también son útiles igualmente en una diversidad de otros análisis de genotipado, por ejemplo, genotipado de SNP usando métodos de prolongación de una base, control a tiempo real de la amplificación, por ejemplo, métodos de RT-PCR y similares.

Pueden encontrarse detalles adicionales respecto a la secuenciación y la amplificación de ácidos nucleicos en Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3.^a Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 ("Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, un proyecto conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado hasta 2006) ("Ausubel") y *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis").

Preparación y aislamiento de polimerasas recombinantes

En general, los ácidos nucleicos que codifican una polimerasa de la invención pueden prepararse por clonación, recombinación, síntesis *in vitro*, amplificación *in vitro* y/u otros métodos disponibles. Puede usarse una diversidad de métodos recombinantes para expresar un vector de expresión que codifica una polimerasa de la invención, por ejemplo, una polimerasa mutante que, sin comprometerse a una teoría particular, reduce la impedancia estérica para un análogo nucleotídico de la invención y/o que incluye una característica de complementariedad. Los métodos recombinantes para preparar ácidos nucleicos, la expresión y el aislamiento de productos expresados se describen, por ejemplo, en Sambrook, Ausubel e Innis.

Además, hay una gran abundancia de kits disponibles en el mercado para la purificación de plásmidos u otros ácidos nucleicos relevantes de las células, (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™, de Stratagene; y, QIAprep™ de Qiagen). Cualquier ácido nucleico aislado y/o purificado puede manipularse adicionalmente para producir otros ácidos nucleicos, usarse para transfectar células, incorporarse en vectores relacionados para infectar organismos para su expresión y/o similares. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores opcionalmente comprenden casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas o procariotas, o ambos (por ejemplo, vectores lanzadera) y marcadores de selección tanto para sistemas procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación y la integración en procariotas, eucariotas o ambos. Véase, Gilman y Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, B., et al., *Protein Expr. Purif.* 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (anteriormente). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, *The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage* publicado anualmente por la ATCC. También se encuentran procedimientos básicos adicionales para secuenciación, clonación y otros aspectos de biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes en Watson et al. (1992) *Recombinant DNA* segunda edición, Scientific American Books, NY.

Además, hay sistemas de componentes ortogonales disponibles que pueden incorporar cualquiera de una diversidad de aminoácidos no naturales en una proteína recombinante (por ejemplo, la polimerasa de la invención). En resumen, se construye una célula u otro sistema de traducción (por ejemplo, un sistema de traducción *in vitro*) que incluye un ARNt ortogonal ("ARNtO"; un ARNt no reconocido por la maquinaria de traducción endógena de la célula, tal como un ARNt ámbar o de 4-bases) y una ARNt sintetasa ortogonal ("ORS"; que es una sintetasa que no aminoacila ningún ARNt endógeno de la célula, pero que puede aminoacilar el ARNtO en respuesta a un codón selector). Se construye un ácido nucleico que codifica la enzima para que incluya un codón selector en un sitio seleccionado que se reconoce específicamente por el ARNtO. La ORS incorpora específicamente un aminoácido no natural con una funcionalidad química deseada en uno o más sitios seleccionados (por ejemplo, distante del sitio activo). Este grupo funcional químico puede ser único en comparación con los encontrados habitualmente en los aminoácidos, por ejemplo, que incorporan funcionalidades ceto u otras funcionalidades. Puede encontrarse información adicional sobre sistemas ortogonales, por ejemplo, en Wang et al., (2001), *Science* 292:498-500; Chin et al., (2002) *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; Chin y Schultz, (2002), *ChemBioChem* 11:1135-1137; Chin, et al., (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; y Wang y Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1-10. Véanse también, las publicaciones internacionales WO 2002/086075, titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS"; WO 2002/085923, titulada "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS;" WO 2004/094593, titulada "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE;" WO 2005/019415, presentada el 7 de julio de 2004; WO 2005/007870, presentada el 7 de julio de 2004; y WO 2005/007624, presentada el 7 de julio de 2004.

Otras referencias útiles, por ejemplo, para el aislamiento y cultivo celular (por ejemplo, para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos) incluyen Freshney (1994) *Culture of Animal Cells*, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en ese documento; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamborg y Phillips (eds) (1995) *Plant Cell*,

Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Además, prácticamente cualquier ácido nucleico puede solicitarse personalizador o convencional de cualquiera de una diversidad de fuentes comerciales, tales como Operon Technologies Inc. (Alameda, CA).

Se conoce una diversidad de métodos de aislamiento y detección de proteínas y pueden usarse para aislar polimerasas, por ejemplo, de cultivos recombinantes de células que expresan las polimerasas recombinantes de la invención. Una diversidad de métodos de aislamiento y detección de proteínas son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los expuestos en R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2.^a edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL impreso en Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL impreso en Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3.^a edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, segunda edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ; y las referencias citadas en esos documentos. Pueden encontrarse detalles adicionales respecto a los métodos de purificación y detección de proteínas en Satinder Ahuja ed., Handbook of Bioseparations, Academic Press (2000).

Kits

La presente invención también proporciona kits que incorporan las polimerasas de la invención, por ejemplo, con uno o más análogos nucleotídicos, por ejemplo, para secuenciación, amplificación de ácidos nucleicos o similares. Dichos kits pueden incluir la polimerasa de la invención envasada de una manera para posibilitar el uso de la polimerasa, un conjunto de diferentes análogos nucleotídicos de la invención, por ejemplo, los que son análogos a A, T, G y C, por ejemplo, donde al menos uno de los análogos alberga un resto detectable, y en aspectos preferidos más de uno y, en muchos casos, cada uno alberga un grupo de marcaje detectablemente diferente, opcionalmente para permitir la identificación en presencia de los otros análogos. Dependiendo de la aplicación deseada, los kits de la invención opcionalmente incluyen reactivos adicionales, tales como nucleótidos naturales, un molde de control y otros reactivos, tales como soluciones tamponantes y/o soluciones salinas, incluyendo, por ejemplo, iones de metales divalentes, es decir, Mg^{++} , Mn^{++} y/o Fe^{++} , soluciones convencionales, por ejemplo, patrones colorantes para el calibrado del detector. Dichos kits también incluyen típicamente instrucciones para el uso de los compuestos y otros reactivos de acuerdo con los métodos de aplicación deseados, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos, amplificación y similares.

Secuencia y variantes de ácidos nucleicos y polipéptidos

Como se describe en este documento, la invención proporciona secuencias polinucleotídicas que codifican, por ejemplo, una polimerasa como se describe en este documento. Los ejemplos de secuencias de polimerasa que incluyen características de impedancia estérica o de complementariedad se encuentran en este documento, por ejemplo, en la tabla 3. Sin embargo, un experto en la materia apreciará inmediatamente que la invención no se limita a esas secuencias. Por ejemplo, un experto apreciará que la invención también proporciona, por ejemplo, muchas secuencias relacionadas con las funciones descritas en este documento, por ejemplo, polinucleótidos y polipéptidos que codifican variantes conservativas de una polimerasa de la tabla 3.

Por consiguiente, la invención proporciona una diversidad de polipéptidos (polimerasas) y polinucleótidos (ácidos nucleicos que codifican polimerasas). Los polinucleótidos ejemplares de la invención incluyen, por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en la tabla 3 o un polinucleótido que es complementario a o que codifica una secuencia polinucleotídica del mismo (por ejemplo, cuando la secuencia dada es un ADN, un ARN es un ejemplo de una secuencia que codifica el ADN, por ejemplo, mediante transcripción inversa). Un polinucleótido de la invención también incluye opcionalmente cualquier polinucleótido que codifica una polimerasa de la tabla 3. A causa de la degeneración del código genético, muchos polinucleótidos codifican de forma equivalente una secuencia dada de polimerasa. Asimismo, un ácido nucleico artificial o recombinante que hibrida con un polinucleótido indicado anteriormente en condiciones de alta rigurosidad sobre sustancialmente toda la longitud del ácido nucleico (y es diferente de un polinucleótido de origen natural) es un polinucleótido de la invención. En una realización, una composición incluye un polipéptido de la invención y un excipiente (por ejemplo, tampón, agua, excipiente farmacéuticamente aceptable, etc.). La invención también proporciona un anticuerpo o antisuero específicamente inmunorreactivo con un polipéptido de la invención (por ejemplo, que reconoce específicamente una característica alterada de impedancia estérica o complementariedad de análogo nucleotídico).

En ciertas realizaciones, un vector (por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, etc.) comprende un polinucleótido de la invención. En una realización, el vector es un vector de expresión. En otra realización, el vector de expresión incluye un promotor unido de forma funcional a uno o más de los polinucleótidos de la invención. En otra realización, una célula comprende un vector que incluye un polinucleótido de la invención.

Un experto también apreciará que se incluyen muchas variantes de las secuencias divulgadas en la invención. Por ejemplo, se incluyen variaciones conservativas de las secuencias divulgadas que producen una secuencia funcionalmente similar en la invención. Las variantes de las secuencias polinucleotídicas de ácido nucleico, en las que las variantes hibridan con al menos una secuencia divulgada, se consideran incluidas en la invención. También se incluyen subsecuencias únicas de las secuencias divulgadas en este documento, determinadas por, por ejemplo, técnicas convencionales de comparación de secuencias, en la invención.

Variaciones conservativas

Debido a la degeneración del código genético, las "sustituciones silenciosas" (es decir, sustituciones en una secuencia de ácido nucleico que no provocan una alteración en un polipéptido codificado) son una característica implícita de todas las secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos. Asimismo, las "sustituciones conservativas de aminoácidos", en las que uno o una cantidad limitada de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos están sustituidos con diferentes aminoácidos con propiedades muy similares, también se identifican fácilmente como muy similares a una construcción divulgada. Dichas variaciones conservativas de cada secuencia divulgada son una característica de la presente invención.

Las "variaciones conservativas" de una secuencia de ácido nucleico particular se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o prácticamente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias prácticamente idénticas. Un experto reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adicionales individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de un 5 %, más típicamente menos de un 4 %, un 2 % o un 1 %) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas de forma conserva" en las que las alteraciones provocan la eliminación un aminoácido, la adición de aminoácido o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar, reteniendo al mismo tiempo la característica relevante de impedancia estérica reducida o complementariedad de análogo nucleotídico (por ejemplo, la sustitución conservativa puede ser de un resto distante a la región de sitio activo). Por tanto, las "variaciones conservativas" de una secuencia polipeptídica enumerada de la presente invención incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, típicamente menos de un 5 %, más típicamente menos de un 2 % o un 1 %, de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, con un aminoácido del mismo grupo de sustituciones conservativas. Finalmente, la adición de secuencias que no alteran la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico, tal como la adición de una secuencia no funcional o de marcaje (intrones en el ácido nucleico, secuencias poli-His o similares en el polipéptido codificado, etc.), es una variación conservativa del ácido nucleico o polipéptido básico.

En un aspecto, la sustitución conservativa incluye una o más eliminaciones o sustituciones de un resto en un resto aminoacídico de la polimerasa correspondiente al resto aminoacídico 375.

Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica, en las que un resto aminoacídico se sustituye por otro resto aminoacídico que tiene propiedades químicas similares (por ejemplo, cadenas laterales aromáticas o cadenas laterales con carga positiva) y, por lo tanto, no cambia sustancialmente las propiedades funcionales de la molécula polipeptídica. Lo siguiente expone grupos ejemplares que contienen aminoácidos naturales de propiedades químicas similares, en los que las sustituciones dentro de un grupo son "sustituciones conservativas".

Tabla A

Sustituciones conservativas de aminoácidos				
Cadenas laterales no polares y/o alifáticas	Cadenas laterales polares, no cargadas	Cadenas laterales aromáticas	Cadenas laterales con carga positiva	Cadenas laterales con carga negativa
Glicina Alanina Valina Leucina Isoleucina Prolina	Serina Treonina Cisteína Metionina Asparagina Glutamina	Fenilalanina Tirosina Triptófano	Lisina Arginina Histidina	Aspartato Glutamato

Hibridación de ácidos nucleicos

Puede usarse la hibridación comparativa para identificar ácidos nucleicos de la invención, incluyendo variaciones conservativas de ácidos nucleicos de la invención. Además, los ácidos nucleicos diana que hibridan con un ácido nucleico representado en la tabla 3 en condiciones de rigurosidad elevada, ultraelevada y ultraultraelevada, donde los ácidos nucleicos son diferentes de una $\Phi 29$ de origen natural, o un mutante N62D, son una característica de la invención. Los ejemplos de dichos ácidos nucleicos incluyen aquellos con una o unas pocas sustituciones de ácido nucleico silenciosas o conservativas en comparación con una secuencia de ácido nucleico dado de la tabla 3.

Se dice que un ácido nucleico de ensayo hibrida específicamente con un ácido nucleico sonda cuando hibrida al menos un 50 % tan bien a la sonda como a la diana complementaria perfectamente coincidente, es decir, con una relación de señal a ruido al menos la mitad de elevada que la hibridación de la sonda con la diana en condiciones en que la sonda perfectamente coincidente se une a la diana complementaria perfectamente coincidente con una relación de señal a ruido que al menos aproximadamente 5x-10x tan elevada como la observada para la hibridación de cualquiera de los ácidos nucleicos diana no coincidentes.

Los ácidos nucleicos "hibridan" cuando se asocian, típicamente en solución. Los ácidos nucleicos hibridan debido a fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como enlaces de hidrógeno, exclusión de disolventes, apilamiento de bases y similares. Se encuentra una amplia guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," (Elsevier, Nueva York), así como en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., Current Protocols, un proyecto conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado hasta 2004) ("Ausubel"); Hames y Higgins (1995) Gene Probes 1 IRL impreso en Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, (Hames y Higgins 1) y Hames y Higgins (1995) Gene Probes 2 IRL impreso en Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 2) proporcionan detalles sobre la síntesis, marcaje, detección y cuantificación de ADN y ARN, incluyendo oligonucleótidos.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios sobre un filtro en una transferencia de Southern o de Northern es un 50 % de formalina con 1 mg de heparina a 42 °C, realizándose la hibridación durante una noche. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con SSC 0,2x a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook, *supra* para una descripción del tampón SSC). A menudo, el lavado de rigurosidad elevada está precedido por un lavado de rigurosidad baja para retirar la señal de fondo de la sonda. Un lavado de rigurosidad baja ejemplar es SSC 2x a 40 °C durante 15 minutos. En general, una relación de señal a ruido de 5x (o mayor) la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

Las "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones de Southern y Northern son dependientes de la secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Se encuentra una amplia guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993), *supra*. y en Hames y Higgins, 1 y 2. Las condiciones de hibridación y lavado rigurosas pueden determinarse fácilmente de forma empírica para cualquier ácido nucleico de ensayo. Por ejemplo, en la determinación de las condiciones de hibridación y lavado rigurosas, las condiciones de hibridación y lavado se aumentan gradualmente (por ejemplo, aumentando la temperatura, disminuyendo la concentración salina, aumentando la concentración de detergente y/o aumentando la concentración de disolventes orgánicos tales como formalina en la hibridación o el lavado), hasta que se cumple un conjunto seleccionado de criterios. Por ejemplo, en condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas, las condiciones de hibridación y lavado se aumentan gradualmente hasta que una sonda se une a una diana complementaria perfectamente coincidente con una relación de señal a ruido que es al menos 5x tan elevada como la observada para la hibridación de la sonda a una diana no coincidente.

Las condiciones "muy rigurosas" se seleccionan para que sean iguales al punto de fusión térmica (T_m) para una sonda particular. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia de ensayo hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Para los fines de la presente invención, en general, las condiciones de hibridación y lavado "altamente rigurosas" se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C por debajo de la T_m para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos.

Las condiciones de hibridación y lavado "de rigurosidad ultraelevada" son aquellas en que la rigurosidad de las condiciones de hibridación y lavado se aumentan hasta que la relación de señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico diana complementario perfectamente coincidente es al menos 10x tan elevada como la observada para la hibridación a cualquiera de los ácidos nucleicos diana no coincidentes. Un ácido nucleico diana que hibrida con una sonda en dichas condiciones, con una relación de señal a ruido de al menos $\frac{1}{2}$ de la del ácido nucleico diana complementario perfectamente coincidente se dice que se une a la sonda en condiciones de rigurosidad ultraelevada.

Asimismo, puede determinarse niveles incluso mayores de rigurosidad aumentando gradualmente las condiciones de hibridación y/o lavado del ensayo de hibridación relevante. Por ejemplo, aquellos en que la rigurosidad de las condiciones de hibridación y lavado se aumentan hasta que la relación de señal a ruido para la unión de la sonda al ácido nucleico diana complementario perfectamente coincidente es al menos 10x, 20x, 50x, 100x o 500x o más tan elevada como la observada para la hibridación con cualquiera de los ácidos nucleicos diana no coincidentes. Un ácido nucleico diana que hibrida con una sonda en dichas condiciones, con una relación de señal a ruido de al menos $\frac{1}{2}$ de la del ácido nucleico diana complementario perfectamente coincidente se dice que se une a la sonda en condiciones de rigurosidad ultraultraelevada.

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones de rigurosidad aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

5 Subsecuencias únicas

En algunos aspectos, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una subsecuencia única en un ácido nucleico que codifica una polimerasa de la tabla 3. La subsecuencia única puede ser única en comparación con un ácido nucleico correspondiente a $\Phi 29$ de tipo silvestre, o a una mutación N62D de la misma. La alineación puede realizarse usando, por ejemplo, BLAST configurado a los parámetros por defecto. Cualquier subsecuencia única es útil, por ejemplo, como sonda para identificar los ácidos nucleicos de la invención.

Asimismo, la invención incluye un polipéptido que comprende una subsecuencia única en una polimerasa de la tabla 3. En este caso, la subsecuencia única es única en comparación con, por ejemplo, $\Phi 29$ de tipo silvestre, o con una mutación N62D de la misma.

La invención también proporciona ácidos nucleicos diana que hibridan en condiciones rigurosas con un oligonucleótido codificante único que codifica una subsecuencia única en un polipéptido seleccionado de las secuencias de la tabla 3, en los que la subsecuencia única es única en comparación con un polipéptido correspondiente a $\Phi 29$ de tipo silvestre, o con una mutación N62D (por ejemplo, secuencias precursoras de las que se obtuvieron las polimerasas de la invención, por ejemplo, por mutación). Las secuencias únicas se determinan como se indica anteriormente.

25 Comparación de secuencias, identidad y homología

Las expresiones "idéntica" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (u otros algoritmos disponibles para los expertos) o por inspección visual.

La expresión "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (por ejemplo, ADN que codifican una polimerasa, o la secuencia de aminoácidos de una polimerasa) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90-95 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o mayor identidad de restos nucleotídicos o aminoácidos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual. Dichas secuencias "sustancialmente idénticas" típicamente se consideran "homólogas", sin referencia a la ascendencia real. Preferentemente, la "identidad sustancial" existe sobre una región de las secuencias que es de al menos aproximadamente 50 restos de longitud, más preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 restos, y mucho más preferentemente, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 restos, o sobre toda la longitud de las dos secuencias a comparar.

Las proteínas y/o secuencias proteínicas son "homólogas" cuando se obtienen, de forma natural o artificial, de una proteína o secuencia proteínica ancestral común. Asimismo, los ácidos nucleicos y/o secuencias de ácido nucleico son homólogos cuando se obtienen, de forma natural o artificial, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. La homología generalmente se deduce de la similitud de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de las mismas). El porcentaje preciso de similitud entre secuencias que es útil a la hora de establecer la homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión, pero se usa de forma rutinaria tan poco como un 25 % de identidad de secuencia sobre 50, 100, 150 o más restos para establecer la homología. Niveles mayores de similitud de secuencia, por ejemplo, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % o mayores, también pueden usarse para establecer la homología. Los métodos para establecer la los porcentajes de similitud de secuencia (por ejemplo, BLASTP y BLASTN usando parámetros por defecto) se describen en este documento y están disponibles en general.

Para la comparación de secuencias y la determinación de la homología, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la una o más secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman,

Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual (véase en líneas generales, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., Current Protocols, un proyecto conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., suplementado hasta 2004).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincide o satisface algún valor umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se menciona como el umbral del valor de palabra adyacente (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra entonces se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo el tiempo que pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (valor recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (valor de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el valor de alineación acumulativo queda fuera por una cantidad X de su valor conseguido máximo; el valor acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de valoración negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un límite de 100, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de valores BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y mucho más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Métodos implementados por ordenador de modelado de la cinética

En un aspecto adicional, la invención incluye métodos implementados por ordenador, por ejemplo, para modelar la cinética enzimática. En los métodos, se define una pluralidad de transiciones de estado de la polimerasa para tramos de tiempo concretos durante una reacción de polimerización basada en molde. En el tramo de tiempo concreto más pequeño, muchas transiciones de estado de la polimerasa están impedidas de acuerdo con la cinética enzimática que se está modelando. Se define una pluralidad de tasas de transición de velocidad entre los estados y una matriz de probabilidades multidimensional de las posibles transiciones de estado para el tramo de tiempo concreto más pequeño, basándose en una secuencia dada del molde de ácido nucleico, los nucleótidos en una mezcla de reacción y las transiciones de estado de la polimerasa. La matriz de probabilidades multidimensional resultante se almacena en un medio legible por ordenador.

Una diversidad de características del método pueden variar. Por ejemplo, las transiciones de estado de la polimerasa opcionalmente son seleccionables por el usuario. Las tasas de transición entre los estados opcionalmente varían dependiendo de la concentración de nucleótidos, la concentración de polimerasa, la concentración de molde, la secuencia del molde, la posición de la polimerasa a lo largo del molde, las características del par de nucleótidos del molde de Watson-Crick actual, las características del par de nucleótidos del molde de Watson-Crick previo o las características del nucleótido que se está incorporando. Los nucleótidos en la mezcla de reacción opcionalmente comprenden uno o más análogos nucleotídicos. Las tasas de transición entre estados opcionalmente incluyen ortogonalidad completa entre todas las combinaciones de dependencias multidimensionales enumeradas anteriormente. La matriz de probabilidades multidimensional opcionalmente se genera automáticamente basándose en la secuencia del molde, una matriz normalizada de estados de probabilidad y los nucleótidos en la mezcla de reacción. La matriz de probabilidades opcionalmente se simplifica asumiendo que todos los posibles emparejamientos de bases de Watson-Crick son equivalentes en todas las transiciones de estado. La matriz de probabilidades opcionalmente se simplifica también asumiendo que ciertas transiciones de estado (por ejemplo, translocación de la polimerasa a lo largo del ADN) son equivalentes entre diferentes dimensiones de la matriz de probabilidades (por ejemplo, ciertas características del nucleótido incorporado previamente).

Asimismo, opcionalmente se genera una segunda matriz de concentración de reactivos para justifica los cambios de concentración de reactivos que se producen por la posición de la polimerasa a lo largo de un molde, basándose en un resultado de la matriz de probabilidades. La matriz de probabilidades opcionalmente se vectoriza para múltiples moldes y la matriz de probabilidades vectorizada resultante puede multiplicarse por la matriz de probabilidades multidimensional para proporcionar una matriz de distribución de estados. Puede usarse un factor de tiempo exponencial para la matriz de probabilidades para justificar las secuencias repetidas dentro de la secuencia de molde. Puede definirse una fracción de emparejamientos incorrectos de nucleótidos por la polimerasa usando un modelo de continuidad o un modelo de recuento.

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son con fines ilustrativos únicamente y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a los expertos en la materia a la luz de los mismos. Por consiguiente, los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Los siguiente expone una serie de experimentos que demuestran la construcción y caracterización de una diversidad de ADN polimerasas recombinantes que tienen regiones de sitio activo modificadas y propiedades modificadas para análogos nucleotídicos.

Ejemplo 1: Expresión de polimerasa recombinante

Se construyó un vector para la expresión de la polimerasa Phi 29 y se ilustra esquemáticamente en la figura 1. Se introdujo una mutación N62D en Phi 29 de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) para reducir la actividad exonucleasa, y se añadieron las marcas GST (glutación-S-transferasa), His y S. La secuencia de aminoácidos de Phi 29 N62D marcada resultante se presenta como la SEQ ID NO:2. La secuencia del vector se presenta como la SEQ ID NO:14. La polimerasa Phi 29 N62D marcada está codificada por los nucleótidos 4839-7428 de la secuencia del vector, con la polimerasa en los nucleótidos 5700-7428 y la mutación N62D en los nucleótidos 5883-5885. Otras características del vector incluyen las secuencias de marca GST-His-S (nucleótidos 4838-5699), el sitio de unión al ribosoma (nucleótidos 4822-4829), el promotor T7 (nucleótidos 4746-4758) y el marcador de resistencia a kanamicina (complemento de los nucleótidos 563-1375).

Se introducen fácilmente mutaciones adicionales en esta construcción según se desee, por ejemplo, para facilitar la expresión de polimerasas Phi 29 recombinantes que tiene regiones de sitio activo modificadas. Véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO:15-23. Las proteínas recombinantes pueden expresarse en *E. coli*, por ejemplo, y purificarse usando las marcas GST, His y/o S y técnicas convencionales. Las marcas se eliminan opcionalmente por digestión con una proteasa apropiada (por ejemplo, trombina o enterocinasa).

Ejemplo 2: Polimerasas recombinantes ejemplares

Se ha construido una diversidad de polimerasas Phi 29 recombinantes con regiones de sitio activo modificadas. Sin la pretensión de limitarse a mecanismo particular alguno, los siguientes ejemplos ilustran modificaciones estructurales que pueden reducir la inhibición estérica de la entrada de análogos nucleotídicos en las regiones de sitio activo modificadas, coordinar los grupos fosfato adicionales proporcionando características que complementan estos grupos (por ejemplo, cadenas laterales de aminoácidos con carga positiva) y/o potenciar de otra manera la capacidad de la polimerasa de incorporar análogos nucleotídicos.

La figura 2, panel A, muestra una alineación de secuencias de polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea los restos 505-525, cuya posición se indica por el paréntesis. Los restos aminoacídicos que difieren de Phi 29 están subrayados. La mayor parte de este dominio se pierde en la ADN polimerasa cp-1 (que, como G1, está relacionada de forma más distante con Phi 29). Además, hay una conservación de secuencia notablemente menor dentro del dominio que en la secuencia flanqueante. Estas observaciones sugieren que la eliminación del dominio es poco probable que sea perjudicial.

Las tres vistas superiores de la figura 2, panel B, ilustran la estructura de la polimerasa Phi 29 (véase, por ejemplo, Kamtekar et al. (2004) "Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage Φ 29" Mol. Cell 16(4): 609-618). Las tres vistas inferiores muestran la polimerasa con los restos 505-525 eliminados, lo que ilustra que la eliminación de este dominio abre el bolsillo de unión al nucleótido. Véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO:12 y 13 o 33 y 34, que eliminan este dominio usando diferentes giros.

La figura 3, panel A, muestra una alineación de secuencias de polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea E375 de Phi 29. Las tres vistas superiores del panel B ilustran la estructura de la polimerasa Phi 29. El glutamato en la posición 375 (indicado por la flecha) está localizado próximo a los restos con carga positiva (K371, K379, K383; representados en gris intermedio con pomos gris oscuro) que contactan con el resto trifosfato del dNTP entrante. Como se ilustra en las tres vistas inferiores del panel B, este aminoácido con carga negativa (E) se reemplazó con uno positivo (H) en un intento por coordinar el fosfato adicional en los análogos nucleotídicos tetrafosfato. Además,

la carga positiva adicional en este sitio puede ayudar a coordinar los análogos trifosfato. El análisis de la polimerasa recombinante sugiere que la mutación E375H ha mejorado la cinética de la enzima para incorporar análogos nucleotídicos marcados con fosfato (véase el ejemplo 3 a continuación). También se construyó el mutante E375S para introducir un resto neutro en esta localización y/o, por ejemplo, para facilitar el cambio conformacional para posibilitar la función. Véanse también las SEQ ID NO:4-7 y 25-28.

La figura 4, panel A, muestra una alineación de secuencias de polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea E486 de Phi 29. Las tres vistas superiores del panel B ilustran la estructura de la polimerasa Phi 29; la localización de E486 está indicada por una flecha. Como se ilustra en las tres vistas inferiores, el remplazo de E486 por un resto de alanina crea más espacio en la región de sitio activo cerca de los carboxilatos catalíticos (D249 y D458, representados en blanco) y elimina una carga negativa. Como otro ejemplo, el remplazo de E486 por un resto de ácido aspártico elimina un carbono, que disminuye la interferencia estérica con la unión del análogo nucleotídico mientras retiene la carga negativa. Véanse también las SEQ ID NO:9-10 y 30-31.

La figura 5, panel A, muestra una alineación de secuencias de polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea K512 de Phi 29. Las tres vistas superiores del panel B ilustran la estructura de la polimerasa Phi 29. K512 (indicado por una flecha) se proyecta desde el dominio de los restos 505-525 y bloquea parcialmente la abertura del sitio de unión al dNTP entrante. Como se ilustra en las tres vistas inferiores, el remplazo de K512 por un resto de alanina reduce la inhibición estérica para la entrada de análogos nucleotídicos en la región de sitio activo, proporcionando más espacio para que entren en el bolsillo de unión. Véanse también las SEQ ID NO:11 y 32.

La figura 6, panel A, muestra una alineación de secuencias de polimerasas de tipo Phi 29 en la región que rodea K135 de Phi 29. Las tres vistas superiores del panel B ilustran la estructura de la polimerasa Phi 29. K135 (indicado por una flecha) se proyecta en la abertura al sitio de unión del dNTP entrante. Como se ilustra en las tres vistas inferiores, el remplazo de K135 por un resto de alanina reduce la inhibición estérica para la entrada de análogos nucleotídicos en la región de sitio activo, proporcionando más espacio para que entren en el bolsillo de unión. Véanse también las SEQ ID NO:3 y 24.

Ejemplo 3: Cribado y caracterización de polimerasas recombinantes

Las polimerasas recombinantes generadas como en el ejemplo 2, o a través de prácticamente cualquier otra estrategia de mutagénesis racional o aleatoria, se caracterizan opcionalmente para determinar sus propiedades para diversos agentes naturales y/o nucleótidos. Se sigue un protocolo ejemplar de cinco etapas para caracterizar las polimerasas recombinantes.

La polimerasa recombinante inicialmente se evalúa sobre la calidad de la preparación de la proteína y la actividad catalítica básica. La actividad de la polimerasa se analiza con nucleótidos naturales (nativos) y se determina su actividad específica (unidades/mg). Se seleccionan únicamente los mutantes catalíticamente competentes para las siguientes etapas.

La capacidad de procesamiento (disociación/kb) de la polimerasa se estima en una reacción de prolongación de cebador realizada en presencia de una "trampa" (ADN competidor no marcado o heparina). El ensayo de capacidad de procesamiento se diseña para seleccionar mutantes que retienen la capacidad de sintetizar un producto de ADN largo en una ejecución de polimerización continua (sin reinicio de la polimerización) con nucleótidos naturales. Los mutantes con una disminución importante en la capacidad de procesamiento no se seleccionan para la siguiente etapa.

Se determina la tasa de polimerización (bases/min) con cuatro análogos a 10 μ M (A488dA4P, A633dC4P, A546dG4P y A594dT4P) y molde circular (AGTC, un molde circular de 72 monómeros que consiste en gran medida en un motivo AGTC repetitivo).

Los mutantes de polimerasa más prometedores se caracterizan por la determinación de la tasa de polimerización y la K_m para A488dC4P y A568dC4P y un subconjunto de nucleótidos naturales (dATP, dGTP y dTTP), usando un molde circular (AGTC). La velocidad se mide a varias concentraciones diferentes de los análogos, A488dC4P (un buen sustrato representativo) y A568dC4P (un sustrato menos preferido representativo).

Se realiza una selección inicial para mutantes de polimerasa con cinética mejorada para análogos nucleotídicos marcados con fosfato terminal, usando un ensayo de prolongación de cebador con análogos nucleotídicos para determinar la tasa con análogos en condiciones experimentales. Típicamente se realizan dos experimentos diferentes, uno en presencia de 10 μ M de A488dC4P, 20 μ M de 3 dNTP-dCTP, y molde circular (AGTC), y uno en presencia de 10 μ M de A568dC4P, 20 μ M de 3 dNTP-dCTP, y molde circular (AGTC).

Opcionalmente se examinan otras características de la polimerasa recombinante, incluyendo, por ejemplo, la fidelidad, el tiempo de residencia ($1/V_{max}$), la actividad exonucleasa (por ejemplo, a 10 μ M, mediante la prolongación de cebador emparejado incorrectamente), la fracción activa (frecuencia de descarga), tasa con dNTP, dN5P, análogos únicamente conectores y/o análogos FRET, cinética (capacidad de utilizar análogos) con Mg^{2+} frente a

Mn²⁺, sensibilidad a fotoalteraciones, unión de ADN monocatenario, estado monomérico (por ejemplo, usando filtración en gel o geles nativos), y/o vida útil.

Los resultados de la evaluación de calidad de la proteína y la determinación de la tasa de polimerización y la constante cinética para polimerasas Phi 29 recombinantes ejemplares se presentan en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Caracterización inicial.

Descripción	Concentración; rendimiento de polimerasa purificada	Actividad específica (unidades/mg)
His-K135A-N62D	3,7 uM; 1 mg	12 454 000
His-E375H-N62D	7,4 uM; 1 mg	10 945 000
His-E375S-N62D	109 uM; 7 mg	10 961 000
His-E486A-N62D	40 uM; 3,5 mg	4 133 000
His-E486D-N62D	36 uM; 3,1 mg	11 634 000
His-K512A-N62D	34 uM; 10 mg	16 073 000
His-NipTuck 1-N62D	32 uM; 2,5 mg	12 400 000
His-NipTuck 2-N62D	4,4 uM; 0,3 mg	7 960 000

Tabla 2. Caracterización de la tasa de polimerización con nucleótidos naturales y análogos nucleotídicos.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
GST-N62D	780	1200	20	1660	74	346	236	65	0,9799
His-N62D	750	1020	21			391	237	68	0,9754
His-K135A-N62D	840	880	24			292	154	43	0,9801
His-E375H-N62D	780	950	8	930	11	411	366	123	0,9510
His-E375S-N62D	940	1190	15	1300	28	420	332	74	0,9815
His-E486A-N62D	1690					303	118	15	0,9875
His-E486D-N62D						220	134	15	0,9885
His-K512A-N62D	1590 (630)					359	196	34	0,9821
His-NipTuck 1-N62D	660	520	24			153	116	24	0,9585
His-NipTuck 2-N62D	540 (1840)					147	129	28	0,9520

Columna A: Descripción.
Columna B: dTTP, dATP, dGTP (sin bifurcación G) V a 20 µM; determinado por un ensayo con tres nucleótidos nativos (dTTP, dATP y dGTP).
Columna C: A488dC4P, k_{el} (pb/min); determinado examinando la dependencia en la concentración de análogo nucleotídico de la tasa de polimerización.
Columna D: A488dC4P, Km; determinado examinando la dependencia en la concentración de análogo nucleotídico de la tasa de polimerización.
Columna E: A568dC4P, k_{el} ; determinado examinando la dependencia en la concentración de análogo nucleotídico de la tasa de polimerización.
Columna F: A568dC4P, Km; determinado examinando la dependencia en la concentración de análogo nucleotídico de la tasa de polimerización.
Columna G: A488dC4P, V a 10 µM; determinado por un ensayo con un único análogo a baja concentración (10 uM) y tres nucleótidos nativos.
Columna H: A568dC4P, V a 10 µM; determinado por un ensayo con un único análogo a baja concentración (10 uM) y tres nucleótidos nativos.
Columna I: A488dA4P, A633dC4P, A546dG4P, A594dT4P, V a 10 µM; determinado por un ensayo con cuatro análogos nucleotídicos marcados en los extremos.
Columna J: Capacidad de procesamiento (kb^{-1}); determinado por un ensayo de capacidad de procesamiento.

Ensayo con un único análogo a baja concentración (10 µM) y tres nucleótidos nativos

La ADN polimerasa Φ29 (enzima precursora o mutante) se preincubó con molde de ADN (ADN circular de 72 nucleótidos que incluye principalmente la secuencia repetitiva AGTC) con cebador de ADN hibridado. La mezcla de preincubación incluye tres nucleótidos nativos (dTTP, dATP y dGTP) y un análogo nucleotídico marcado en un extremo (A488dC4P o A568dC4P) a concentración 10 µM. Después de una corta preincubación, la reacción se inició con MnCl₂. La reacción se detuvo con EDTA, y los productos se separaron usando electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron con SYBR Gold (Invitrogen). La longitud promedio del ADN generado con la ADN polimerasa se determinó y se usó para estimar la tasa de polimerización. Véase, por ejemplo, la tabla 2, columnas G y H.

Ensayo con cuatro análogos nucleotídicos marcados en los extremos

El procedimiento es básicamente como se describe anteriormente en la sección titulada "Ensayo con un único análogo a baja concentración (10 µM) y tres nucleótidos nativos", con la excepción de que en este ensayo todos los nucleótidos están marcados en un extremo (A488dA4P, A633dC4P, A546dG4P, A594dT4P todos 10 µM). Véase, por ejemplo, la tabla 2, columna I.

Ensayo con tres nucleótidos nativos (dGTP, dTTP y dATP)

La ADN polimerasa $\Phi 29$ (enzima precursora o mutante) se preincubó con molde de ADN (ADN circular que incluye principalmente la secuencia repetitiva CAT, sin restos de G) con cebador de ADN hibridado; la mezcla de preincubación incluye tres nucleótidos nativos (dTTP, dATP y dGTP). Todas las etapas posteriores fueron básicamente como se describe anteriormente en la sección titulada "Ensayo con un único análogo a baja concentración (10 μM) y tres nucleótidos nativos". Véase, por ejemplo, la tabla 2, columna B.

La dependencia en la concentración de análogo nucleotídico de la tasa de polimerización

La ADN polimerasa $\Phi 29$ (enzima precursora o mutante) se preincubó con un molde de ADN (ADN circular de 72 nucleótidos que incluye principalmente la secuencia repetitiva AGTC) con cebador de ADN hibridado. La mezcla de preincubación incluye también tres nucleótidos nativos (dTTP, dATP y dGTP 20 μM cada uno) y diversas concentraciones del análogo marcado en un extremo (A488dC4P o A568dC4P). Todas las etapas posteriores fueron básicamente como se describe anteriormente en la sección titulada "Ensayo con un único análogo a baja concentración (10 μM) y tres nucleótidos nativos". Se determinó una longitud promedio de los productos de ADN generados con la ADN polimerasa a una concentración de análogo individual, y los resultados se ajustaron con la ecuación $k = k_{\text{el}}[S](K_d + [S])^{-1}$ en la que k es la tasa de polimerización observada, k_{el} es la tasa de polimerización a una concentración de saturación de sustrato (k_{el} mide la incorporación de múltiples restos) y $[S]$ es la concentración de sustrato. Véase, por ejemplo, la tabla 2, columnas C, D, E y F.

Ensayo de capacidad de procesamiento

La ADN polimerasa $\Phi 29$ (enzima precursora o mutante) se preincubó con molde de ADN (ADN circular de 72 nucleótidos que incluye principalmente la secuencia repetitiva AGTC) con cebador de ADN hibridado. Después de una corta preincubación, la reacción se inició con una mezcla de inicio que incluía MnCl_2 , dNTP y heparina. Incluir la heparina en la reacción evita que se reinicie la polimerización después de que la polimerasa se haya disociado del molde/cebador, de modo que todos los productos de ADN generados son el resultado de ejecuciones de polimerización continuas. Después de 20 min de incubación, la reacción se detuvo con EDTA, y los productos se separaron usando electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron con SYBR Gold (Invitrogen). Los productos de ADN se analizaron básicamente como se describe en Bibillo A, Eickbush TH. J Biol Chem. 20 de septiembre de 2002; 277(38):34836-45, Epub 5 de julio de 2002. Los resultados se ajustaron con la ecuación exponencial única $A \cdot \exp(-P_{\text{off}} \cdot kb)$ en la que A es la amplitud, P_{off} es la probabilidad de disociación prematura de la polimerasa, y kb es la longitud del ADN (1000 nucleótidos). La probabilidad de elongación de la cadena (capacidad de procesamiento) puede calcularse fácilmente restando el valor P_{off} de 1,0. Véase, por ejemplo, la tabla 2, columna J.

Secuencias de polimerasas recombinantes ejemplares

Las secuencias de aminoácidos y polinucleotídicas de Phi 29 de tipo silvestre y polimerasas recombinantes ejemplares se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencias.

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
1	secuencia de aminoácidos de Phi 29 de tipo silvestre	mkhmpkrkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hnlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgddidyhk erpvgykitp eeyayikndi qiiaaealliq fkqgldrmta gsdslkgfkd iittkkfkkv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslpagaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhiqhirc efelkegyip
		tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwnsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwti kttsegaikq laklmlnsly gkfasnpdvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaagacyd riicycdtdsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakyrlrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
2	secuencia de aminoácidos de N62D (marcada)	m s p i l g y w k i k g l v q p t r l l l e y l e e k y e e h l y e r d e g d k w r n k k f e l g l e f p n l p y y i d g d v k l t q s m a i i r y i a d k h n m l g g c p k e r a e i s m l e g a v l d i r y g v s r i a y s k d f e t l k v d f l s k l p e m l k m f e d r l c h k t y l n g d h v t h p d f m l y d a l d v v l y m d p m c l d a f p k l v c f k k r i e a i p q i d k y l k s s k y i a w p l q g w q a t f g g g d h p p k s d g s t s g s g h h h h h s a g l v p r g s t a i g m k e t a a a k f e r q h m d s p d l g t g g g s g d d d d k s p m g y r g s e f m k h m p r k m y s c d f e t t t k v e d c r v w a y g y m n i e d h s e y k i g n s l d e f m a w v l k v q a d l y f h d l k f d g a f i i n w l e r n g f k w s a d g l p n t y n t i i s r m g q w y m i d i c l g y k g k r k i h t v i y d s l k k l p f p v k k i a k d f k l t v l k g d i d y h k e r p v g y k i t p e e y a y i k n d i q i i a e a l l i q f k q g l d r m t a g s d s l k g f k d i i t t k k f k k v f p t l s l g l d k e v r y a y r g g f t w l n d r f k e k e i g e g m v f d v n s l y p a q m y s r l l p y g e p i v f e g k y v w d e d y p l h i q h i r c e f e l k e g y i p t i g i k r s r f y k g n e y l k s s g g e i a d l w l s n v d l e l m k e h y d l y n v e y i s g l k f k a t t g l f k d f i d k w t y i k t t s e g a i k q l a k l m l n s l y g k f a s n p d v t g k v p y l k e n g a l g f r l g e e t k d p v y t p m g v f i t a w a r y t t i t a a q a c y d r i i y c d t d s i h l t g t e i p d v i k d i v d p k k l g y w a h e s t f k r a k y l r q k t y i q d i y m k e v d g k l v e g s p d d y t d i k f s v k c a g m t d k i k k e v t f e n f k v g f s r k m k p k p v q v p g g v v l v d d t f t i k
3	secuencia de aminoácidos de K135A-N62D (marcada)	m s p i l g y w k i k g l v q p t r l l l e y l e e k y e e h l y e r d e g d k w r n k k f e l g l e f p n l p y y i d g d v k l t q s m a i i r y i a d k h n m l g g c p k e r a e i s m l e g a v l d i r y g v s r i a y s k d f e t l k v d f l s k l p e m l k m f e d r l c h k t y l n g d h v t h p d f m l y d a l d v v l y m d p m c l d a f p k l v c f k k r i e a i p q i d k y l k s s k y i a w p l q g w q a t f g g g d h p p k s d g s t s g s g h h h h h s a g l v p r g s t a i g m k e t a a a k f e r q h m d s p d l g t g g g s g d d d d k s p m g y r g s e f m k h m p r k m y s c d f e t t t k v e d c r v w a y g y m n i e d h s e y k i g n s l d e f m a w v l k v q a d l y f h d l k f d g a f i i n w l e r n g f k w s a d g l p n t y n t i i s r m g q w y m i d i c l g y k g k r k i h t v i y d s l k k l p f p v k k i a a d f k l t v l k g d i d y h k e r p v g y k i t p e e y a y i k n d i q i i a e a l l i q f k q g l d r m t a g s d s l k g f k d i i t t k k f k k v f p t l s l g l d k e v r y a y r g g f t w l n d r f k e k e i g e g m v f d v n s l y p a q m y s r l l p y g e p i v f e g k y v w d e d y p l h i q h i r c e f e l k e g y i p t i g i k r s r f y k g n e y l k s s g g e i a d l w l s n v d l e l m k e h y d l y n v e y i s g l k f k a t t g l f k d f i d k w t y i k t t s e g a i k q l a k l m l n s l y g k f a s n p d v t g k v p y l k e n g a l g f r l g e e t k d p v y t p m g v f i t a w a r y t t i t a a q a c y d r i i y c d t d s i h l t g t e i p d v i k d i v d p k k l g y w a h e s t f k r a k y l r q k t y i q d i y m k e v d g k l v e g s p d d y t d i k f s v k c a g m t d k i k k e v t f e n f k v g f s r k m k p k p v q v p g g v v l v d d t f t i k
4	secuencia de aminoácidos de E375H-N62D (marcada)	m s p i l g y w k i k g l v q p t r l l l e y l e e k y e e h l y e r d e g d k w r n k k f e l g l e f p n l p y y i d g d v k l t q s m a i i r y i a d k h n m l g g c p k e r a e i s m l e g a v l d i r y g v s r i a y s k d f e t l k v d f l s k l p e m l k m f e d r l c h k t y l n g d h v t h p d f m l y d a l d v v l y m d p m c l d a f p k l v c f k k r i e a i p q i d k y l k s s k y i a w p l q g w q a t f g g g d h p p k s d g s t s g s g h h h h h s a g l v p r g s t a i g m k e t a a a k f e r q h m d s p d l g t g g g s g d d d d k s p m g y r g s e f m k h m p r k m y s c d f e t t t k v e d c r v w a y g y m n i e d h s e y k i g n s l d e f m a w v l k v q a d l y f h d l k f d g a f i i n w l e r n g f k w s a d g l p n t y n t i i s r m g q w y m i d i c l g y k g k r k i h t v i y d s l k k l p f p v k k i a k d f k l t v l k g d i d y h k e r p v g y k i t p e e y a y i k n d i q i i a e a l l i q f k q g l d r m t a g s d s l k g f k d i i t t k k f k k v f p t l s l g l d k e v r y a y r g g f t w l n d r f k e k e i g e g m v f d v n s l y p a q m y s r l l p y g e p i v f e g k y v w d e d y p l h i q h i r c e f e l k e g y i p t i g i k r s r f y k g n e y l k s s g g e i a d l w l s n v d l e l m k e h y d l y n v e y i s g l k f k a t t g l f k d f i d k w t y i k t t s h g a i k q l a k l m l n s l y g k f a s n p d v t g k v p y l k e n g a l g
		f r l g e e t k d p v y t p m g v f i t a w a r y t t i t a a q a c y d r i i y c d t d s i h l t g t e i p d v i k d i v d p k k l g y w a h e s t f k r a k y l r q k t y i q d i y m k e v d g k l v e g s p d d y t d i k f s v k c a g m t d k i k k e v t f e n f k v g f s r k m k p k p v q v p g g v v l v d d t f t i k

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
5	secuencia de aminoácidos de E375S-N62D (marcada)	m s p i l g y w k i k g l v q p t r l l l e y l e e k y e e h l y e r d e g d k w r n k k f e l g l e f p n l p y y i d g d v k l t q s m a i i r y i a d k h n m l g g c p k e r a e i s m l e g a v l d i r y g v s r i a y s k d f e t l k v d f l s k l p e m l k m f e d r l c h k t y l n g d h v t h p d f m l y d a l d v v l y m d p m c l d a f p k l v c f k k r i e a i p q i d k y l k s s k y i a w p l g g w q a t f g g g d h p p k s d g s t s g s g h h h h h s a g l v p r g s t a i g m k e t a a a k f e r q h m d s p d l g t g g g s g d d d d k s p m g y r g s e f m k h m p r k m y s c d f e t t t k v e d c r v w a y g y m n i e d h s e y k i g n s l d e f m a w v l k v q a d l y f h d l k f d g a f i i n w l e r n g f k w s a d g l p n t y n t i i s r m g q w y m i d i c l g y k g k r k i h t v i y d s l k k l p f p v k k i a k d f k l t v l k g d i d y h k e r p v g y k i t p e e y a y i k n d i q i i a e a l l i q f k q g l d r m t a g s d s l k g f k d i i t t k k f k k v f p t l s l g l d k e v r y a y r g g f t w l n d r f k e k e i g e g m v f d v n s l y p a q m y s r l l p y g e p i v f e g k y v w d e d y p l h i q h i r c e f e l k e g y i p t i q i k r s r f y k g n e y l k s s g g e i a d l w l s n v d l e l m k e h y d l y n v e y i s g l k f k a t t g l f k d f i d k w t y i k t t s s g a i k q l a k l m l n s l y g k f a s n p d v t g k v p y l k e n g a l g f r l g e e e t k d p v y t p m g v f i t a w a r y t t i t a a q a c y d r i i y c d t d s i h l t g t e i p d v i k d i v d p k k l g y w a h e s t f k r a k y l r g k t y i q d i y m k e v d g k l v e g s p d d y t d i k f s v k c a g m t d k i k k e v t f e n f k v g f s r k m k p k p v q v p g g v v l v d d t f t i k
6	secuencia de aminoácidos de E375K-N62D (marcada)	m s p i l g y w k i k g l v q p t r l l l e y l e e k y e e h l y e r d e g d k w r n k k f e l g l e f p n l p y y i d g d v k l t q s m a i i r y i a d k h n m l g g c p k e r a e i s m l e g a v l d i r y g v s r i a y s k d f e t l k v d f l s k l p e m l k m f e d r l c h k t y l n g d h v t h p d f m l y d a l d v v l y m d p m c l d a f p k l v c f k k r i e a i p q i d k y l k s s k y i a w p l g g w q a t f g g g d h p p k s d g s t s g s g h h h h h s a g l v p r g s t a i g m k e t a a a k f e r q h m d s p d l g t g g g s g d d d d k s p m g y r g s e f m k h m p r k m y s c d f e t t t k v e d c r v w a y g y m n i e d h s e y k i g n s l d e f m a w v l k v q a d l y f h d l k f d g a f i i n w l e r n g f k w s a d g l p n t y n t i i s r m g q w y m i d i c l g y k g k r k i h t v i y d s l k k l p f p v k k i a k d f k l t v l k g d i d y h k e r p v g y k i t p e e y a y i k n d i q i i a e a l l i q f k q g l d r m t a g s d s l k g f k d i i t t k k f k k v f p t l s l g l d k e v r y a y r g g f t w l n d r f k e k e i g e g m v f d v n s l y p a q m y s r l l p y g e p i v f e g k y v w d e d y p l h i q h i r c e f e l k e g y i p t i q i k r s r f y k g n e y l k s s g g e i a d l w l s n v d l e l m k e h y d l y n v e y i s g l k f k a t t g l f k d f i d k w t y i k t t s k g a i k q l a k l m l n s l y g k f a s n p d v t g k v p y l k e n g a l g f r l g e e e t k d p v y t p m g v f i t a w a r y t t i t a a q a c y d r i i y c d t d s i h l t g t e i p d v i k d i v d p k k l g y w a h e s t f k r a k y l r g k t y i q d i y m k e v d g k l v e g s p d d y t d i k f s v k c a g m t d k i k k e v t f e n f k v g f s r k m k p k p v q v p g g v v l v d d t f t i k
7	secuencia de aminoácidos de E375R-N62D (marcada)	m s p i l g y w k i k g l v q p t r l l l e y l e e k y e e h l y e r d e g d k w r n k k f e l g l e f p n l p y y i d g d v k l t q s m a i i r y i a d k h n m l g g c p k e r a e i s m l e g a v l d i r y g v s r i a y s k d f e t l k v d f l s k l p e m l k m f e d r l c h k t y l n g d h v t h p d f m l y d a l d v v l y m d p m c l d a f p k l v c f k k r i e a i p q i d k y l k s s k y i a w p l g g w q a t f g g g d h p p k s d g s t s g s g h h h h h s a g l v p r g s t a i g m k e t a a a k f e r q h m d s p d l g t g g g s g d d d d k s p m g y r g s e f m k h m p r k m y s c d f e t t t k v e d c r v w a y g y m n i e d h s e y k i g n s l d e f m a w v l k v q a d l y f h d l k f d g a f i i n w l e r n g f k w s a d g l p n t y n t i i s r m g q w y m i d i c l g y k g k r k i h t v i y d s l k k l p f p v k k i a k d f k l t v l k g d i d y h k e r p v g y k i t p e e y a y i k n d i q i i a e a l l i q f k q g l d r m t a g s d s l k g f k d i i t t k k f k k v f p t l s l g l d k e v r y a y r g g f t w l n d r f k e k e i g e g m v f d v n s l y p a q m y s r l l p y g e p i v f e g k y v w d e d y p l h i q h i r c e f e l k e g y i p t i q i k r s r f y k g n e y l k s s g g e i a d l w l s n v d l e l m k e h y d l y n v e y i s g l k f k a t t g l f k d f i d k w t y i k t t s r g a i k q l a k l m l n s l y g k f a s n p d v t g k v p y l k e n g a l g f r l g e e e t k d p v y t p m g v f i t a w a r y t t i t a a q a c y d r i i y c d t d s i h l t g t e i p d v i k d i v d p k k l g y w a h e s t f k r a k y l r g k t y i q d i y m k e v d g k l
		v e g s p d d y t d i k f s v k c a g m t d k i k k e v t f e n f k v g f s r k m k p k p v q v p g g v v l v d d t f t i k

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
8	secuencia de aminoácidos de L384R-N62D (marcada)	mspilgywki kglvqprrll leyaleekyee hlyerdegdk wrnkkfelgl efpnlpyyid gdvklqtqsm iiriyadkhn mlggcpkera eismlegavl dirygvrsria yskdfetlkv dflsklpeml kmfedrlchk tylngdhvth pdfmlydald vvllymdpmcl dafpklvcfk kriaaipgid kylksskyia wplqgwqatf gggdhppksd gstsghghh hhsaglvpr gstaigmket aaakferghm dspdlgtggg sgdddkspm gyrgsefmkh mprkmyscdf etttkvedcr vwaygymnie dhseykigns ldefmawvlk vqadlyfhdl kfdgafiinw lerngfkwsa dglpntynti isrmgqwymi diclgykgkr kihtviydsi kklpfpvkki akdfklvtlk gdidyhkerp vgykitpeey ayikndiqii aealliqfkq glrmtagsd slkgfkdiit tkkfkkvfpt lslgldkevr yayrggftwl ndrfekeig egmfvdvnsi ypaqmysrll pygepivfeg kyvwdedyp lhighircefe lkegyiptiq ikrsrfykgn eylkssggei adlwlsnvd elmkehydly nveysglkf kattglfkdf idkwtiykt segaikqlak mlmslygkf asnpdvgtkv pylkengalg frlgeeetkd pvytpmgvfi tawaryttit aaqacydrii ycdtdsihlt gteipdvikd idvpkklgyw ahestfkrak ylrqktyiqd iymkevdgkl vegspddytd ikfsvkcagm tdkikkevtf enfkvgsrsk mkpkpvqvpq gvvlvddtft ik
9	secuencia de aminoácidos de E486A-N62D (marcada)	mspilgywki kglvqprrll leyaleekyee hlyerdegdk wrnkkfelgl efpnlpyyid gdvklqtqsm iiriyadkhn mlggcpkera eismlegavl dirygvrsria yskdfetlkv dflsklpeml kmfedrlchk tylngdhvth pdfmlydald vvllymdpmcl dafpklvcfk kriaaipgid kylksskyia wplqgwqatf gggdhppksd gstsghghh hhsaglvpr gstaigmket aaakferghm dspdlgtggg sgdddkspm gyrgsefmkh mprkmyscdf etttkvedcr vwaygymnie dhseykigns ldefmawvlk vqadlyfhdl kfdgafiinw lerngfkwsa dglpntynti isrmgqwymi diclgykgkr kihtviydsi kklpfpvkki akdfklvtlk gdidyhkerp vgykitpeey ayikndiqii aealliqfkq glrmtagsd slkgfkdiit tkkfkkvfpt lslgldkevr yayrggftwl ndrfekeig egmfvdvnsi ypaqmysrll pygepivfeg kyvwdedyp lhighircefe lkegyiptiq ikrsrfykgn eylkssggei adlwlsnvd elmkehydly nveysglkf kattglfkdf idkwtiykt segaikqlak mlmslygkf asnpdvgtkv pylkengalg frlgeeetkd pvytpmgvfi tawaryttit aaqacydrii ycdtdsihlt gteipdvikd idvpkklgyw ahestfkrak ylrqktyiqd iymkevdgkl vegspddytd ikfsvkcagm tdkikkevtf enfkvgsrsk mkpkpvqvpq gvvlvddtft ik
10	secuencia de aminoácidos de E486D-N62D (marcada)	mspilgywki kglvqprrll leyaleekyee hlyerdegdk wrnkkfelgl efpnlpyyid gdvklqtqsm iiriyadkhn mlggcpkera eismlegavl dirygvrsria yskdfetlkv dflsklpeml kmfedrlchk tylngdhvth pdfmlydald vvllymdpmcl dafpklvcfk kriaaipgid kylksskyia wplqgwqatf gggdhppksd gstsghghh hhsaglvpr gstaigmket aaakferghm dspdlgtggg sgdddkspm gyrgsefmkh mprkmyscdf etttkvedcr vwaygymnie dhseykigns ldefmawvlk vqadlyfhdl kfdgafiinw lerngfkwsa dglpntynti isrmgqwymi diclgykgkr kihtviydsi kklpfpvkki akdfklvtlk gdidyhkerp vgykitpeey ayikndiqii aealliqfkq glrmtagsd slkgfkdiit tkkfkkvfpt lslgldkevr yayrggftwl ndrfekeig egmfvdvnsi ypaqmysrll pygepivfeg kyvwdedyp lhighircefe lkegyiptiq ikrsrfykgn eylkssggei adlwlsnvd elmkehydly nveysglkf kattglfkdf idkwtiykt segaikqlak mlmslygkf asnpdvgtkv pylkengalg frlgeeetkd pvytpmgvfi tawaryttit aaqacydrii ycdtdsihlt gteipdvikd idvpkklgyw ahdstfkrak ylrqktyiqd iymkevdgkl vegspddytd ikfsvkcagm tdkikkevtf enfkvgsrsk mkpkpvqvpq gvvlvddtft ik
11	secuencia de aminoácidos de K512A-N62D (marcada)	mspilgywki kglvqprrll leyaleekyee hlyerdegdk wrnkkfelgl efpnlpyyid gdvklqtqsm iiriyadkhn mlggcpkera eismlegavl dirygvrsria yskdfetlkv dflsklpeml kmfedrlchk tylngdhvth pdfmlydald vvllymdpmcl dafpklvcfk kriaaipgid kylksskyia wplqgwqatf gggdhppksd gstsghghh hhsaglvpr gstaigmket aaakferghm dspdlgtggg sgdddkspm gyrgsefmkh mprkmyscdf etttkvedcr vwaygymnie dhseykigns ldefmawvlk vqadlyfhdl kfdgafiinw lerngfkwsa dglpntynti isrmgqwymi diclgykgkr kihtviydsi kklpfpvkki akdfklvtlk gdidyhkerp vgykitpeey ayikndiqii aealliqfkq glrmtagsd slkgfkdiit tkkfkkvfpt lslgldkevr yayrggftwl ndrfekeig egmfvdvnsi ypaqmysrll pygepivfeg kyvwdedyp lhighircefe lkegyiptiq ikrsrfykgn eylkssggei adlwlsnvd elmkehydly nveysglkf kattglfkdf idkwtiykt segaikqlak mlmslygkf asnpdvgtkv pylkengalg frlgeeetkd pvytpmgvfi tawaryttit aaqacydrii ycdtdsihlt gteipdvikd idvpkklgyw ahestfkrak ylrqktyiqd iymkevdgal vegspddytd ikfsvkcagm tdkikkevtf enfkvgsrsk mkpkpvqvpq gvvlvddtft ik

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
12	secuencia de aminoácidos de NipTuck_1-N62D (eliminación de los restos 505-525) (marcada)	mspilgywki kglvqprrll leyaleekyee hlyerdegdk wrnkkfelgl efpnlpyyid gdvklqtqsm iiriyadkhn mlggcpkera eismlegavl dirygvsria yskdfetlkv dflsklpeml kmfedrlchk tylngdhvth pdfmlydald vlymdpmcl dafpklvckf kriaaipqid kylksskyia wplqgwqatf gggdhppksd gstsgsghhh hhsaglvpr gstaigmket aaakferqhm dspdlgtggg sgdddkspg gyrgsefmkh mprkmyscdf etttkvedcr vwaygymnie dhseykigns ldefmawvlk vqadlyfhdl kfdgafiinw lerngfkwsa dglpntynti isrmgqwymi diclgykgkr kihtviydsi kklpfpvkki akdfklvtvk gdidyhkerp vgykitpeey ayikndiqii aealliqfkq glrmtagsd slkgfkdiit tkkfkkvfpt lslgldkevr yayrggftwl ndrfekeig egmvfdvnsi ypaqmysrll pygepivfeg kyvwdedyp lhighircefe lkegyiptiq ikrsrfykgn eylkssggei adlwlsnvd elmkehydly nveyisglkf kattglfkdf idkwtyiktt segaikqlak lmlnslygkf asnpdvtgkv pylkengalg frlgeeetkd pvytpmgvfi tawaryttit aagacydrii ycdtdsihlt gteipdvikd idvpkklgyw ahestfkra ylrqktyiqd ikdgefsvkc agmtdkikke vtfevfkgvf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
13	secuencia de aminoácidos de NipTuck_2-N62D (eliminación de los restos 505-525) (marcada)	mspilgywki kglvqprrll leyaleekyee hlyerdegdk wrnkkfelgl efpnlpyyid gdvklqtqsm iiriyadkhn mlggcpkera eismlegavl dirygvsria yskdfetlkv dflsklpeml kmfedrlchk tylngdhvth pdfmlydald vlymdpmcl dafpklvckf kriaaipqid kylksskyia wplqgwqatf gggdhppksd gstsgsghhh hhsaglvpr gstaigmket aaakferqhm dspdlgtggg sgdddkspg gyrgsefmkh mprkmyscdf etttkvedcr vwaygymnie dhseykigns ldefmawvlk vqadlyfhdl kfdgafiinw lerngfkwsa dglpntynti isrmgqwymi diclgykgkr kihtviydsi kklpfpvkki akdfklvtvk gdidyhkerp vgykitpeey ayikndiqii aealliqfkq glrmtagsd slkgfkdiit tkkfkkvfpt lslgldkevr yayrggftwl ndrfekeig egmvfdvnsi ypaqmysrll pygepivfeg kyvwdedyp lhighircefe lkegyiptiq ikrsrfykgn eylkssggei adlwlsnvd elmkehydly nveyisglkf kattglfkdf idkwtyiktt segaikqlak lmlnslygkf asnpdvtgkv pylkengalg frlgeeetkd pvytpmgvfi tawaryttit aagacydrii ycdtdsihlt gteipdvikd idvpkklgyw ahestfkra ylrqktyiqd idgfsvkcag mtdkikkevt fenfkvgfssr kmkpkpvqvp ggvvlvddtf tik

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
14	secuencia de nucleótidos de N62D - plásmido pET41 N62D 1	tggcgaaatgggacgcgcctgttagcggcgacattaagcggcggggtgtgg tggttacgcgcagcgtgacgcgtacacttgccagcgccttagcgcgcct cctttcgctttcttcccttcttcttctcgccacggttcgcgggttttccccg tcaagctctaaatcgggggctcccttttaggggttcgatttttagtgctttac ggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatgggttcacgtagtggg ccatcgccctgatagacggttttttcgccctttgacggttgaggtccacggt ctttaatagtggactcctgttccaaactggaacaacactcaaccctatct cggctctattcttttgatttataagggattttgcgatttcggcctattgg ttaaaaaatgagctgattttaacaaaaatttaacgcgaatttttaacaaaat attaacggtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaa cccctatttgttttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatg aattaatctctagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttat tcataatcaggattatcaataaccataatttttgaaaaagccgtttctgta gaaggagaaaaactcacgcaggcagttccataggatggcaagatcctggta tcgggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcc cctcgtcaaaaaataagggttatcaagtgcgaaatcaccatgagtgacgact gaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttccagacttggttc aacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcgtatcaaccaaac cgttattcattcgtgatttgccgctgagcgcgagacgaaatacgcgcatcgtg ttaaaaggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacac tgccagcgcacaaacataattttcacctgaatcaggataattcttctataa cctggaatgctgttttcccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatca tcaggagtagcggataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgt cagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcctgcgaacgctac ctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaat cgatagattgtgcacctgattgcccgcacattatcgcgagcccatttata cccatataaaatcagcatccatgttggaaatttaatcgcggccttagagcaag acgtttcccggttgaatatgggtcataacacccttgattactgtttatg taagcagacagttttattgtttcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttt cgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaaagatcaaaggatcttcttga gatccttttttctgcgcgtaattctgctgcttgcaaacaaaaaaaccacc gctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttc cgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaaataactgtccttcta gtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtgacaccgcctac atacctcgtctgttaatacctgttaccagtggctgctgccagtggcgata agtcgtgtcttacccgggttgactcaagacgatagttaccgggataaggcg cagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagccagcttgagagcg aacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcg ccacgcttcccgaaggaggagaaaggcgacaggtatccggtaagcggcagg gtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggta tctttatagtcctgtcgggttttcgccacctctgacttgagcgtcgatttt tgtgatgctcgtcagggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcg gcctttttacgggttcctggccttctgttggttcttgcacatgttctt tctgcggttatccctgattctgtggataaacgtattaccgccttttgagt gagctgataaccgctcgcgcgagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtg agcggaggaagcggagagcgcctgatgcgggtattttctccttacgcactc gtgcgggtattttcacaccgcatatatgtgtgactctcagtacaatctgctc tgatgcgcgcatagtttaagccagtatacactccgctatcgctcgcgtgactg ggctcatggctgcgcccgcacaccgcgaacaccgcgtcagcgcctgcgac gggcttgctcgtcctccggcatcgccttacagacaagctgtgacccgtctcc gggagctgcatgtgtcagagggttttcaccgctcatcaccgaaacgcgcgag gcagctgcggtaaaagctcatcagcgtgggtcgtgaagcgattcacagatgt ctgctgtttcatcccgctccagctcgtttgagtttctccagaagcgttaat gtctggcttctgataaaagcgggcatgtttaaggcggttttttctcgttt ggtcactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatga taccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaa

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
		catgcccggttactggaacgttgtgagggtaaacactggcggtatggat gcggcgggaccagagaaaaatcactcaggggtcaatgccagcgcttcgtta atacagatgtaggtgttcacagggtagccagcagcatcctgcgatgcag atccggaacataaatgggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagacttta cgaaacacggaaaccgaagaccattcatgtttgttgcctcagggtcgcagacg ttttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcgggtgattcatte tgctaaccagtaaggcaacccccgccagcctagccgggtcctcaacgacag gagcacgatcatgtagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactg ggttgaaggctctcaagggtcgcgtcgagatccccgggtgcctaatgagtg agctaacttacattaattgcgttgcgtcactgccccgctttccagtcggg aaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagag gcgggtttgcgtattgggcgccaggggtgggtttttcttttcaccagtgagac gggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctgagagagttgcagca agcgggtccacgctggttttgcggcagcaggcgaaaatcctgtttgatggg gttaacggcgggatataacatgagctgtcttcgggtatcgtcgtatccac taccgagatgtccgcaccaacgcgcagcccgactcggtaatggcgcgca ttgcgcccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaaacg atgccctcattcagcatttgcattggtttgttgaaaaccggacatggcact ccagtgccttcccggttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagat atttatgccagccagccagacgcagacgcgcgagacagaacttaatggg cccgctaacagcgcgattttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccac gccagtcgcgtaccgtcttcatgggagaaaaataactgttgatgggtg tctggtcagagacatcaagaaataacgcgggaacattagtgcaggcagct tccacagcaatggcactcctggtcatccagcggatagttaatgatcagccc actgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgcgcgtttacaggcttcga cgccgcttcgtttctaccatcgacaccaccaacgctggcaccagttgatcg gcgcgagatttaatcgccgcgacaatttgcgcagcgcgcgtgcagggccag actggaggtggcaacgccaatcagcaacgactggtttgcccgcagttggt gtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatccgcgcttccact ttttcccgcttttgcagaaacgtggctggcctgggttcaccacgcggga aacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgtta ctgggtttcacattcaccaccctgaattgactctcttccggcgctatcat gccataccgcgaaagggttttgcgccattcgatgggtgtccgggatctcgac gctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagccagtagtaggttg agggcgttgagcacgcgcgcgcaagggaatgggtgcattgcaaggagatggc gccaacagtcccccgccacggggcctgccaccatacccacgccgaaac aagcgtcatgagcccggaagtggcgagcccgatcttccccatcgggtgatg tcggcgatatagggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggc cacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatcgatctcgatcccgcgaaat taatacgactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctcta gaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatgtcccctata ctaggttatggaaaattaagggccttgtgcaaccactcgacttctttt ggaatatcttgaagaaaaatatgaagagcatttgtatgagcgcgatgaag gtgataaatggcgaaacaaaaagtttgaattgggtttggagtttcccaat cttccttattatattgatgggtgatgttaattaacacagctctatggccat catacgttatatagctgacaagcacacatgttgggtgggttgtccaaaag agcgtgcagagatttcaatgcttgaaggagcgggttttggatattagatac gggtgtttcgagaattgcataatagtaaagactttgaaactctcaaagttga ttttcttagcaagctacctgaaatgctgaaaatgttcgaagatcgtttat gtcataaaacataatttaaatgggtgatcatgtaacccatcctgacttcatg ttgtatgacgctcttgatgttgttttatacatggacccaatgtgcctgga tgcgttcccaaaattagtttgttttaaaaaacgtattgaagctatcccac aaattgataagtacttgaaatccagcaagtatatagcatggcctttgcag ggctggcaagccacglttggtgggtggcgaccatcctccaaaatcggatgg

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
		ttcaactagtggttcttggtcatcaccatcaccatcactccgcgggtctgg tgccacgcggtagtactgcaattgggtatgaaagaaaccgctgctgctaaa ttcgaaacgcccagcacatggacagcccagatctgggtaccgggtgggtgctc cgggtgatgacgacgacaagagtcctcatgggatatcggggatccgaattca tgaagcatatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactact aaagtgggaagactgtagggtatgggcgtatgggttatatgaatatagaaga tcacagtgagttacaaaataggtaatagcctggatgagtttatggcgtggg tgttgaagggtacaagctgatctatatctccatgatctcaaatttgacgga gcttttatcattaaactgggtgggaacgtaattgggttttaagtggtcggctga cggattgccaaacacatataatacagatcatatctcgcatgggacaatgggt acatgattgatataatgttttaggctacaaagggaaacgtaagatacataca gtgatataatgacagcttaaagaaactaccgtttcctgttaagaagatagc taaagactttaactaactgttcttaaggtgatattgattaccacaag aaagaccagtcggctataagaataacacccgaagaatacgcctatatataa aacgatattcagattattgcggaagctctgttaattcagtttaagcaagg tttagaccggatgacagcaggcagtgacagctcaaaaggtttcaaggata ttataaccactaagaaattcaaaaaggtgtttcctacattgagtccttggga ctcgataaggaagtgagatacgcctatagagggtgggtttacatgggttaaa tgatagggttcaaagaaaaagaaatcggaagaggcatgggtctcgatgtta atagttctatatcctgcacagatgtatagtcgtctccttccatatggtgaa cctatagttatcgagggtaaatacgtttggggacgaagattaccactaca catacagcatatcagatgtgagttcgaaattgaaagagggctatataccca ctatacagataaaaaagaagtaggtttataaaggttaattgagtagcctaaaa agtagcggcggggagatagccgacctctgggttgtaaatgtagactataga attaatgaaagaacactacgatttatataacgttgaaatatatcagcgggt taaaatttaaagcaactacaggtttgttttaagatttttatagataaatgg acgtacatcaagacgacatcagaaggagcgatcaagcaactagcaaaact gatgttaaacagtcctatacggtaaatcgcctagtaacccctgatgttacag ggaaagtcccttattttaaagagaatggggcgctagggtttcagacttggga gaagaggaaacaaaagacctgtttatacaccctatggggcggttttcacac tgcatgggctagatacacagacaattacagcggcacagggcttggttatgatc ggataatatactgtgatactgacagcatatatttaacgggtacagagata cctgatgtaataaaagatatagttgaccctaagaaattgggatacctgggc acatgaaagtacattcaaaagagctaaatatctgagacgagaagactata tacaagacatctatatgaaagaagtagatggtaagttagtagaaggtagt ccagatgattacactgatataaaaatttagtggttaaatgtgcgggaatgac tgacaagattaaagaaagaggttacgtttgagaatttcaaaagtcggattca gtcggaaaaatgaagcctaagcctgtgcaagtgcggggcggggtgggtctg gttgatgacacattcacaaatcaataagaattctgtacagggccttggcgc gcctgcaggcgagctccgtcgacaagcttgccggccactcgagcaccac caccaccaccaccaccactaattgatttaatacctaggctgctaaacaaag cccgaaaggaagctgagttggctgctgcccaccgtcgagcaataactagca taacccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgcgtgaaagg aggaactatatccggat
15	secuencia de nucleótidos de K135AN62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactactaaagtgggaagctgtagg tatggcggtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtagtaaaataggtaaatagcctggatgagtt tatggcggtgggtgttgaaaggtacaagctgatctatatctccatgatctcaaatttgacggagcttttatc ataaactgggttggaacgttaattgttttaagtggtcgggtgacggattgccaacacatataaatcagatca tatctcgcatgggacaatggtacatgattgatataatgttttaggtacaaaggggaaacgtaagatcacatc agtgataatgacagcttaagaaactaccgttttctgttaagaagatagctgccgactttaaaactaaact gtttttaagggtgatattgattaccacaaagaaagaccagtcggctataagataaacacccgaagaatcgc cctatatataaaacgatattcagattattgcggaagctctgttaattcagtttaagcaaggttttagaccg gatgacagcaggcagtgacagctctaaaaggtttcaaggatattataaccactaagaaattcaaaaaggtg tttctacattgagttctggactcgataaggaagtgagatcgcctatagaggtgggttttatcatgggttaa atgatagggttcaaaagaaaaagaaatcggaagggcatgggtcttcgatgttaatagttctatatcctgcaca gatgtatagtcgtctctccatcagggtgaacctatagttatcgagggttaaatcagttttgggaaggaat taccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaaattgaaagagggcttatataccactatcacaga taaaaagaagtaggttttataaaggttaattgagttacctaaaagtagcggcggggagatagccgacctctg gttgtaaatgtagaccagaaatttaataagaaacactacgatttatataacggttgaaatatatcagcggc ttaaattttaagcaactacaggtttgtttaaagattttatagataaaatggagctacatcaagcagacat cagaaggagcgtacagcaactagcaaaactgatgttaaacagctctatcagggttaaatcgcgtagtaacc tgatgttacagggaagtcctcttatttaaaagagaatggggcgctagggtttcagacttggagaagaggaa acaaaagacctgcttatacacatatggggcggttttcacacacgtgaggttagatatacagcacaattacag cgacacaggttgggttatgatcgggataatatactgtgatactgacagcatcacatttaacgggtacagagat acctgatgtaataaaagatatagttgaccttaagaaattgggatactggggacacgaaagtagcatcctaaa agagctaaatatctgagacagaagacctatatacagacatctatatgaagagagtagatgggttaagttag tagaaggttagtcagatgattacactgatataaaatttagtggttaaatgtgcgggaatgactgacaagat taagaaagaggttacgttttgagaatttcaaaagtcggatcagtcggaaatgaagcctaagcctgtgcaa gtgcggggcggggtgggtcttggtgatgacacattcacaaataa

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
16	secuencia de nucleótidos de E375H-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactactaaagtgggaagactgtagggtatggggtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtaacaaataggtaacagcctggatgagttatggcgtgggtgttgaagggtacaagctgatactatatttccatgatctcacaatttgacgggagcttttatcattaaactgggttgaacgttaaggttttaagtggtcggtcgacggattgccaaacacataataacgatacattatcgcattgggacaatgggtacatgattgatatagtttagggtacaagggaagcgttaagatacatacagtgataatgacagcttaaaagaaactaccgtttccctgttaagaagatagctaaagactttaaactaaactgttcttaaagggtgataattgattaccacaagaagaagaccagtcggctataagataaacaccggaagaatcgcctatattaaaaacgatattcagattatttcggaagctctgttaattcagtttaagcaaggtttagaccggatgacagcaggtgacagctcaaaagggttcaaggatattataaccacaaagaaattcaaaaagggttttccctacattgagctcttgactcgataagggaagtgagatacgcctatagagggtgggtttacatgggttaaagataggttcaaaagaaaaagaaatcgggagaaggcattggcttcgatgttaatagttctatatcttcgcacagatgatagatcgctccctccatagcgtgaacctatagatttcgagggttaaatagctttgggacgaagattaccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaaagagggtctacataccactatacagataaaaaagaaagtaggttttataaaggtaatgagttacctaataaagtagcggcggggagatagccgacctctggttgcataatgtagaccctagaatttaagaaagaacactacgatttatataacgttgaatatacagcgggttataaatttaaagcaactacaggtttgttttaaagattttatagataaattggacgtacataacagcagcatcacaggagcgatcaagcaactagcaaaactgagtttaaacagttctatacggtaaaatttcgctagtaaccccgtatgtttacagggaaggtcccttatttaaagagaattggggcgctagggtttcagacttgggaagagggaacaaaagacctgtttatcacacctatggggttttctacactgcatgggctagatcacagcaaatccacagcggcacaggtctgtttatgatcgggataatactgtgatactgacagcatcacattaaagggttgcagagatccctgatgtaataaaagataatagttgacctaaagaattgggatactacggcacatgcaattcctaaagagctaaatatctgagacagaagacctatatacaagacatctatatgaagaagtagatggtaagttagtagaaggtagtcacagatgattacactgataataaatttagtgttaaatgtcggggaatgacgcagaagatcaagaaagaggttacgttttgagaatttcaaaagtcggatttcagtcgggaaatgaagcctaaagcctgtgcaaagtgcggggcggtgggttctgggttgatgacacattcacaaatcaataaa
17	secuencia de nucleótidos de E375S-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactactaaagtgggaagactgtagggtatggggtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtaacaaataggtaacagcctggatgagttatggcgtgggtgttgaagggtacaagctgatactatatttccatgatctcacaatttgacgggagcttttatcattaaactgggttgaacgttaaggttttaagtggtcggtcgacggattgccaaacacataataacgatacatalctcgcattgggacaatgggtacatgattgatatagttttaggtctacaaggggaacgttaagatacatacagtgataatgacagcttaaaagaaactaccgtttccctgttaagaagatagctaaagactttaaactaaactgttcttaaagggtgataattgattaccacaagaagaagaccagtcggctataagataaacaccggaagaatcgcctatattaaaaacgatattcagattatttcggaagctctgttaattcagtttaagcaaggtttagaccggatgacagcaggtgacagctcaaaagggttcaaggatattataaccactaagaaattcaaaaagggtgtttccctacattgagttctggactcgataaaggaagtgaatcacgcctatagagggtgttttatcatgggttaaagataggttcaaaagaaaaagaaatcgggagaaggcattggcttcgatgttaatagttctatatcttcgcacagatgatagtcgtctccctccatagcgtgaacctatagatttcgagggttaaatcagttttgggacgaagattaccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaaagagggtctatataccactatacagataaaaaagagtaggttttataaaggtaatgagttacctaataaagtagcggcggggagatagccgacctctgtgttcaaatgtagacctagaatttaagaaagaacactacgatttatataacgttgaatataatacagcggcttaaaatttaaagcaactacaggtttgttttaaagattttatagataaattggacgtacatacagacagcatcaagcggagcgatcaagcaactagcaaaactgagtttaaacagttctatacgttaaatccgctagtaaaccttgatgtttacagggaaggtcccttatttaaagagaatggggcgctagggtttcagacttgggaagagggaacaaaagacctgtttatcacacctatggggtgtttctacactgcatgggctagatacacgacaattacagcggcacagggtctgttatgacgggataatatactgtgatactgacagcatcacattcaacgggttacagagcatcttgatgtaataaaagataatagttgacctaaagaattgggatacttgggcacatgaaggtacattcaaaagagctaaatatctgagacagaagacctatatacaagacatctatatgaagaagtagatggtaagtttagtagaaggtagtcacagatgattacactgataataaatttagtgttaaatgtcggggaatgactgacaagatcaagaaagaggttacgttttgagaatttcaaaagtcggatttcagtcgggaaatgaagcctaaagcctgtgcaaagtgcggggcggtgggttctgggttgatgacacattcacaaatcaataaa
18	secuencia de nucleótidos de L384R-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactactaaagtgggaagactgtagggtatggggtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtaacaaataggtaacagcctggatgagttatggcgtgggtgttgaagggtacaagctgatactatatttccatgatctcacaatttgacgggagcttttatcattaaactgggttgaacgttaaggttttaagtggtcggtcgacggattgccaaacacataataacgatacattatcgcattgggacaatgggtacatgattgatatagtttagggtacaagggaagcgttaagatacatacagtgataatgacagcttaaaagaaactaccgtttccctgttaagaagatagctaaagactttaaactaaactgttcttaaaggtgataattgattaccacaagaagaagaccatcgcgtataaagataaacaccggaagaatcgcctatattaaaaacgatattcagattatttcggaagctctgttaattcagtttaagcaaggtttagaccggatgacagcaggtgacagctcaaaagggttcaaggatattataaccactaagaaattcaaaaagggtgtttccctacattgagttctggactcgataaaggaagtgaatcacgcctatagagggtgttttatcatgggttaaagataggttcaaaagaaaaagaaatcgggagaaggcattggcttcgatgttaatagttctatatcttcgcacagatgtatagtcgtctccctccatagcgtgaacctatagatttcgagggttaaatcagcttgggacgaagattaccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaaagagggtctatataccactatacagataaaaaagagtaggttttataaaggtaatgagttacctaataaagtagcggcggggagatagccgacctctggttgtcaaatgttagacctagaatttaagaaagaacactacgatttatataacgttgaatataatcagcggcttcaaaatttaaagcaactacaggtttgttttaaagattttatagataaattggacgtacatacagacagcatcagaaggagcgatcaagcaactagcaaaacggatgttaaacagttctatacgggttaaatctgcctagtaacccctgattgttacagggaaggtcccttatttaaagagaatggggcgctagggtttcagacttgggaagagggaacaaaagacctgtttatcacacctatggggtgtttctacactgcatgggctagatacacgacaattacagcggcacagggtctgttatgacgggataatatactgtgatactgacagcatcacattcaacgggttacagagatccctgattgaataaaagataatagttgacctaaagaattgggatacttgggcacatgaaggtacattcaaaagagctaaatatctgagacagaagacctatatacaagacatctatatgaagaagtagatggtaagtttagtagaaggtagtcacagatgattacactgataataaatttagtgttaaatgtcggggaatgactgacaagatcaagaaagaggttacgttttgagaatttcaaaagtcggatttcagtcgggaaatgaagcctaaagcctgtgcaaagtgcggggcggtgggttctgggttgatgacacattcacaaatcaataaa

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
19	secuencia de nucleótidos de E486A-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgacttttgagacaactactaaagtgggaagactgttaggg tatgggcgtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtagacaaaataggtaaatagcctggatgagtt tatggcgtgggtgttgaagggtacaagctgacttatattccatgatctcaaatttgacgggagcttttatc attaactgggttggaacgtaatgggttttaagtgggtcggtcgacggatbgccaaacacataataacgatca tatctcgcatgggaacaatgggtacatgattgatatatggtttagggtacaaaggggaacgttaagatacatac agtgatataatgacagctttaaagaaactaccgtttccctgttaagaagatagctaaagactttaaactaact gttctttaaagggtgatatgtattaccacaagaagaagaccagtcggctataagataaacaccggaagaataccg cctatatataaaacagatattcagattatttgcgggaagctctgttaattccagtttaagcaaggtttagaccg gatgacagcaggcagtgacagctttaaagggtttcaaggatattataaccactaagaatttcaaaaagggtg tttccatcatattgagctctgggactcgataaaggagtgagatacgcctatagagggtgggtttacatgggttaa atgataagggttcaaaagaaaagaaatcgggagaaggcatgggtcttcgatgttaaatagttctatatctcgcaca gatgtatagtcgtctctctccataccggtgaacctatagttatcgagggttaaatacgtttgggacgaagat taccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaaagggggttatataccactatcacaga taaaaagaagtaggttttataaaggtaactgagttacctaataaaggtagcggcggggagatagccgacctctg gttgcctcaaatgtagacctaagaatttaagaaagaacactacgatttataacgttgaatataatcagcgcc tataaaatgtagacctaagaatttgaacctaaagaattgggatactgggcacatgccagacattcaaa agagctaaatatctgagacagaagacctatatacaagacatctatatgaagaagtagatggttaagttag tagaaggtagtccagatgattacactgataaaaaatttagtgttaaatgtgcgggaatgactgacaagat taagaaagaggttacgtttgagaatttcaaaagtcggatttcagtcggaaaatgaagcctaagcctgtgcaa gtgcccggcggggtgggtcttggttgatgacacattcacaatcaataa
20	secuencia de nucleótidos de E486D-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgacttttgagacaactactaaagtgggaagactgttaggg tatgggcgtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtagacaaaataggtaaatagcctggatgagtt tatggcgtgggtgttgaagggtacaagctgacttatattccatgatctcaaatttgacgggagcttttatc attaactgggttggaacgtaatgggttttaagtgggtcggtcgacggatbgccaaacacataataacgatca tatctcgcatgggaacaatgggtacatgattgatatatggtttagggtacaaaggggaacgttaagatac agtgatataatgacagctttaaagaaactaccgtttccctgttaagaagatagctaaagactttaaactaact gttctttaaagggtgatatgtattaccacaagaagaagaccagtcggctataagataaacaccggaagaatcag cctatatataaaacagatattcagattatttgcgggaagctctgttaattccagtttaagcaaggtttagaccg gatgacagcaggcagtgacagctttaaagggtttcaaggatattataaccactaagaatttcaaaaagggtg tttccatcatattgagctctgggactcgataaaggagtgagatacgcctatagagggtgggtttacatgggttaa atgataagggttcaaaagaaaagaaatcgggagaaggcatgggtcttcgatgttaaatagttctatatctcgcaca gatgtatagtcgtctctctccataccggtgaacctatagttatcgagggttaaatagctttgggacgaagat taccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaaagggggttatataccactatcacaga taaaaagaagtaggttttataaaggtaatgagttacctaataaaggtagcggcggggagatagccgacctctg gttgcctcaaatgtagacctaagaatttaagaaagaacactacgatttataacgttgaatataatcagcgcc tataaaatgtagacctaagaatttgaacctaaagaatttataagataaatggcgtagatacagagcagat cagaaggagcagatcaagcaactagcaaaactgatgttaaacagttctatacggtaaatctcagtagtaaccc tgatgtttacaggggaagctcccttatttaaaagagaatggggcgctagggtttcagactttgggagaagggaa acaaaagacctgtttataacacctatgggcgttttcatcactgcattgggctagatatacagcaaatcacag cgscacaggcttgttatgactcgataatatactgtgatactgacagcatacatattaacgggttacagagat acctgtatgataaaagatagtttgcacctaaagaattgggatactgggcacatgacagtagacattcaaa agagctaaatatctgagacagaagacctatatacaagacatctatatgaagaagtagatggttaagttag tagaaggtagtccagatgattacactgataaaaaatttagtgttaaatgtgcgggaatgactgacaagat taagaaagaggttacgtttgagaatttcaaaagtcggatttcagtcggaaaatgaagcctaagcctgtgcaa gtgcccggcggggtgggtcttggttgatgacacattcacaatcaataa
21	secuencia de nucleótidos de K512A-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgacttttgagacaactactaaagtgggaagactgttaggg tatgggcgtatgggttatatgaatatagaagatcacagtgagtagacaaaataggtaaatagcctggatgagtt tatggcgtgggtgttgaagggtacaagctgacttatattccatgatctcaaatttgacgggagcttttatc attaactgggttggaacgtaatgggttttaagtgggtcggtcgacggatbgccaaacacataataacgatca tatctcgcatgggaacaatgggtacatgattgatatatggtttagggtacaaaggggaacgttaagatacat agtgatataatgacagctttaaagaaactaccgtttccctgttaagaagatagctaaagactttaaactaact gttctttaaagggtgatatgtattaccacaagaagaagaccagtcggctataagataaacaccggaagaatcag cctatatataaaacagatattcagattatttgcgggaagctctgttaattccagtttaagcaaggtttagaccg gatgacagcaggcagtgacagctttaaagggtttcaaggatattataaccactaagaatttcaaaaagggtg tttccatcatattgagctctgggactcgataaagggaagtgagatacgcctatagagggtgggtttacatgggttaa atgataagggttcaaaagaaaagaaatcgggagaaggcatgggtcttcgatgttaaatagttctatatctcgcaca gatgtatagtcgtctctctccataccggtgaacctatagttatcgagggttaaatacgtttgggacgaagat taccactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaaagggggttatataccactatcacaga taaaaagaagtaggttttataaaggtaactgagttacctaataaaggtagcggcggggagatagccgacctctg gttgcctcaaatgtagacctaagaatttaagaaagaacactacgatttataacgttgaatataatcagcgcc tataaaatgtagacctaagaatttgaacctaaagaatttataagataaatggcgtagatacagagcagat cagaaggagcagatcaagcaactagcaaaactgatgttaaacagttctatacggtaaatctcagtagtaaccc tgatgtttacaggggaagctcccttatttaaaagagaatggggcgctagggtttcagactttgggagaagggaa acaaaagacctgtttataacacctatgggcgttttcatcactgcattgggctagatatacagcaaatcacag cgscacaggcttgttatgactcgataatatactgtgatactgacagcatacatattaacgggttacagagat acctgtatgataaaagatagtttgcacctaaagaattgggatactgggcacatgacagtagacattcaaa agagctaaatatctgagacagaagacctatatacaagacatctatatgaagaagtagatggttaagttag tagaaggtagtccagatgattacactgataaaaaatttagtgttaaatgtgcgggaatgactgacaagat taagaaagaggttacgtttgagaatttcaaaagtcggatttcagtcggaaaatgaagcctaagcctgtgcaa gtgcccggcggggtgggtcttggttgatgacacattcacaatcaataa

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
22	secuencia de nucleótidos de NipTuck_1-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactactaaagtggagactgttaggg tatgggctgtatgggttatcatgaatatagaagatcacagtgagttacaaaataggtaatagcctggatgagtt tatggcgtgggtgttgaaagtacaagctgattctatatcccatgatctcctaaatttgacggagctttttatc attaacggttggaacgtaatgggttttaagtggctggctgacggatttgccaaacacataataacagatca tatctcgcgtgggacaatgggtacatgattgatatatgttttaggctacaaagggaaacgtaagatacatatc agtgatatatgacagcttaaagaaactaccgtttcctgttaagaagatagctaaagactttaactaact gttcttaagggtgatattgatataccacaaagaaagaccagtcggctataagataaacccgaagaatacgc cctatatataaaacagatattcagattattgcggaagctctgttaattcagtttaagcaaggttttagaccg gatgacagcaggcagtgacagctctaaaggtttcaaggatattataaccactaagaaattcaaaaggtg tttctacattgagctcttgacagctcgataaggaagtgagatacgcctatagagggtggttttacatgggttaa atgatagggtcaaaagaaagaaatcggagaaggcatggctcttcgatttaattagtttaattatctctgcaca gatgtatagtcgtctccttccatcacaggtgaacctatagttatcgagggttaatacgttttgggacgaagat taccacactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattcgaagaggggtatataccactatacaga taaaagaaagtaggtttttataaaggtaattgagtaacataaaagtagcgggcgaggagatagccgacctctg gttgtcaaatgtagacctaagaattaatgaagaacacactecgatttatataagcttgaatatatcagcgcc ttaaaatttaagcaactacaggtttgtttaaagattttatagataaactgggcacgtacacataagacacat cagaaggagcgatcaagcaactagcaaaactgatgttaaacagttctatccggttaatttcgtagtaaccc tgatgttacaggggaaagtcccttattttaaagagaatggggcgctagggttcagacttgggagagggaa acaaaagacctgtttatcacacctatggcggttttcatcactgcactgggttagatcacagcacaattacag cggcacagggctgtttatgatcggaataatactgtgatactgacagcatatcattacgggttacagagat acctgatgtataaaagatagatttgacctaaagaattgggatactgggcacgtacgaatgatacgcacaa agagctaaatatctgagacagagaagacctatatacaagacatcaaggatggagaggttagtgttaaatgtg cggaattgactgacaggaattagaagaagggttacgtttgagaatttcaagctcggttcagtcgggaaat gaagccttgacgttgcaagtgccggcggggtgggtctcgtgtgatgacacattcacaattcaaat
23	secuencia de nucleótidos de NipTuck_2-N62D	atgaagcacatgccgagaaagatgtatagttgtgactttgagacaactactaaagtggagactgttaggg tatgggctgtatgggttatcatgaatatagaagatcacagtgagttacaaaataggtaatagcctggatgagtt tatggcgtgggtgttgaaagtacaagctgattctatatcccatgatctcctaaatttgacggagctttttatc attaactgggttggaacgtaatgggttttaagtggctggctgacggatttgccaaacacataataacagatca tatctcgcgtgggacaatgggtacatgattgatatatgttttaggctacaaagggaaacgtaagatacatatc agtgatatatgacagcttaaagaaactaccgtttcctgttaagaagatagctaaagactttaactaact gttcttaagggtgatattgatataccacaaagaaagaccagtcgggtataagataaacccgaagaatacgc cctatatataaaacagatattcagattattgcggaagctctgttaattcagtttaagcaaggttttagaccg gatgacagcaggcagtgacagctctaaaggtttcaaggatattataaccactaagaaattcaaaaggtg tttctacattgagctcttgacagctcgataaggaagtgagatacgcctatagagggtggttttacatgggttaa atgatagggtcaaaagaaagaaatcggagaaggcatggctcttcgattgttaattagtttatattcctgcaca gatgtatagtcgtctccttccatcacaggtgaacctatagttatcgagggttaatacgttttgggacgaagat taccacactacacatacagcatatcagatgtgagttcgaattgaagaggggtatataccacacatacaga taaaagaaagtaggtttttataaaggtaattgagtaacataaaagtagcgggcgaggagatagccgacctctg gttgtcaaatgtgacctaagaattaatgaagaacacactacgatttatataacgttgaatatatcagcgcc ttaaaatttaagcaactacaggtttgtttaaagattttatagataaattggacgtatcatcaagacgacat cagaaggagcgatcaagcaactagcaaaactgatgttaaacagttctatccggttaatttcgtagtaaccc tgatgttacaggggaaagtcccttattttaaagagaatggggcgctagggttcagacttgggagagggaa acaaaagacctgtttatcacacctatggcggttttcatcactgcactgggttagatcacagcacaattacag cggcacagggctgtttatgatcggaataatactgtgatactgacagcatatcattacgggttacagagat acctgatgtataaaagatagatttgacctaaagaattgggatactgggcacatgaaagtacattcaaa agagctaaatatctgagacagagaagacctatatacaagacatcgacggcttttagtgttaaatgtgcgggaa tgactgacaagattagaagaagggttacgtttgagaatttcaagctcggttcagtcgggaaatgaagcc taagcctgtgcaagtgccggcggggtgggtctcgtgtgatgacacattcacaattcaaat
24	secuencia de aminoácidos de K135A-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidiyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaealliq fkqglrmta gsdslkgfkfd iittkkfkfv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslpammys rllpygepiv fegkyvded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwnsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttshgaikq laklmlnsly gkfasnpsvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaagacyd riiycdtdsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
25	secuencia de aminoácidos de E375H-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidiyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaealliq fkqglrmta gsdslkgfkfd iittkkfkfv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslpammys rllpygepiv fegkyvded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwnsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttshgaikq laklmlnsly gkfasnpsvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaagacyd riiycdtdsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik

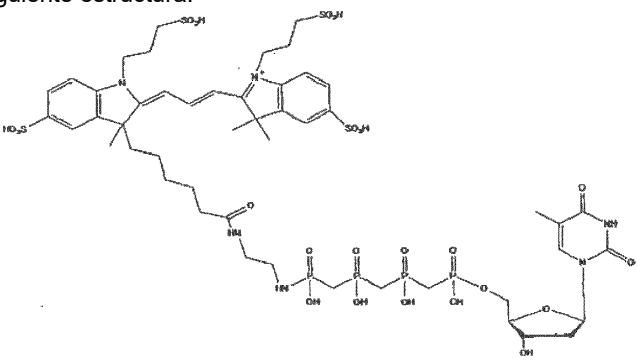
SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
26	secuencia de aminoácidos de E375S-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfkv fptlslgldk evryayrggf twlnrfrkek eigegmvfdv nsllypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsagaikq laklmlnsly gkfasnpgvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
27	secuencia de aminoácidos de E375K-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfkv fptlslgldk evryayrggf twlnrfrkek eigegmvfdv nsllypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsagaikq laklmlnsly gkfasnpgvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
28	secuencia de aminoácidos de E375R-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfkv fptlslgldk evryayrggf twlnrfrkek eigegmvfdv nsllypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsagaikq laklmlnsly gkfasnpgvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
29	secuencia de aminoácidos de L384R-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfkv fptlslgldk evryayrggf twlnrfrkek eigegmvfdv nsllypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsagaikq laklmlnsly gkfasnpgvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
30	secuencia de aminoácidos de E486A-N62D	mkhmprkmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykity eeyayikndi qiiaaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfkv fptlslgldk evryayrggf twlnrfrkek eigegmvfdv nsllypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhiqhirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsagaikq laklmlnsly gkfasnpgvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahestfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik

SEQ ID NO:	Notas	Secuencia
31	secuencia de aminoácidos de E486D-N62D	mkhmpkrmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykitp eeyayikndi qiiaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhighirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsegaikq laklmlnsly gkfasnpdvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahdstfk rakylrqkty iqdiymkev d gklvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
32	secuencia de aminoácidos de K512A-N62D	mkhmpkrmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykitp eeyayikndi qiiaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhighirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsegaikq laklmlnsly gkfasnpdvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahdstfk rakylrqkty iqdiymkev d galvegspdd ytdikfsvkc agmtdkikke vtfenfkvgf srkmkpkpvq vpggvvlvdd tftik
33	secuencia de aminoácidos de de NipTuck_1-N62D (eliminación de los restos 505-525)	mkhmpkrmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykitp eeyayikndi qiiaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhighirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsegaikq laklmlnsly gkfasnpdvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahdstfk rakylrqkty iqdikdfeis vkcagmtkiki kkevtfenfk vgfsrkmkpk pvqvpvggvvl vddtftik
34	secuencia de aminoácidos de de NipTuck_2-N62D (eliminación de los restos 505-525)	mkhmpkrmys cdfetttkve dcrvwaygym niedhseyki gnsldefmaw vlkvqadlyf hdlkfdgafi inwlerngfk wsadglpnty ntiisrmgqw ymidiclgyk gkrkihtviy dslkklpfpv kkiakdfklt vlkgdidyhk erpvgykitp eeyayikndi qiiaealliq fkqglrmta gsdslkgfkf iittkkfkfv fptlslgldk evryayrggf twlndrfkek eigegmvfdv nslypaqmys rllpygepiv fegkyvwded yplhighirc efelkegyip tiqikrsrfy kgneylkssg geiadlwlsn vdlelmkehy dlynveyisg lkfkattglf kdfidkwtiy kttsegaikq laklmlnsly gkfasnpdvt gkvpylkeng algfrlgeee tkdpvytpmg vfitawaryt titaaqacyd riiycdttsi hltgteipdv ikdivdpkkl gywahdstfk rakylrqkty iqdidgfsvk cagmtdkikk evtfenfkvg fsrkmkpkpv qvpvggvvlv dtftik

Caracterización de polimerasas recombinantes con análogos nucleotídicos

5 La K_m y la V_{max} se determinaron para polimerasas Phi29 recombinantes ejemplares y diversos análogos nucleotídicos. Los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. K_m y V_{max} frente a los análogos.								
Mutación	K_m^1	V_{max}^1	K_m^2	V_{max}^2	K_m^3	V_{max}^3	K_m^4	V_{max}^4
N62D	23	610	20	540	838	2500	68	1620
N62D:E375H	17	800	15	526	433	1250		
N62D:E375S	16,5	1158					40	1981
N62D:E375K	12	595						
N62D:E375Y	2,5	773	6,6	471	440	1430	18	1292
N62D:E375W	1,8	889	5,0	595	248	1428	16	1585

Mutación	Km ¹	Vmax ¹	Km ²	Vmax ²	Km ³	Vmax ³	Km ⁴	Vmax ⁴
¹ Medido para Alexa633-O-dC4P (también mencionado como A633dC4P en este documento)								
² Medico para Alexa555-C2-dT4P. Este análogo tiene un conector de 2 carbonos ("C2") entre el fosfato delta y el resto marcador y tiene la siguiente estructura:								
								
³ Medico para Alexa555-C2-dTTP								
⁴ Medico para Alexa532-O-dG4P								

Se caracterizó un conjunto de polimerasas Phi29 recombinantes ejemplares con diversos nucleótidos y/o análogos nucleotídicos. Los resultados se presentan en la tabla 5.

5

Tabla 5. Datos de cribado.

Mutación	Relación (baja/elevada) ¹	Tasa elevada ²	Tasa Hz ³	Mutación 2 ⁴	Marca(s) ⁵
E375W	0,677	699,4	19,1	N62D	His
E375Y	0,694	498,5	12-1	N62D	His
E375H	0,445	510,1	9,4	N62D	His
E375Q	0,356	531,6	6,3	N62D	His
E375K	0,425	516,1	6,2	N62D	His
E375S	0,335	528,4	5,9	N62D	His
E375A	0,383	465,9	5,8	N62D	His
T15I	0,355	416,5	3,0		His
N62D	0,355	349,3	2,8		GST-His
N62D	0,362	373,2	2,7		His
K135A	0,412	272,0	1,6	N62D	His
K512A	0,335	347,7	1,4	N62D	His
NipTuck1	0,508	192,4	1,3	N62D	His
D12A	0,888	55,3	1,2		GST-His
E486A	0,441	152,5	1,0	N62D	His
E486D	0,467	142,0	0,9	N62D	His
T15I	0,726	105,9	0,0	N62D	His
NipTuck2	0,635	156,3	0,0	N62D	His
L384R	0,768	79,6	-0	N62D	His

¹Relación = (tasa a 5 μ M de A633dC4P con 20 μ M de dA, dG, dTTP)/(tasa a 25 μ M de A633dC4P con 20 μ M de dA, dG, dTTP) a 1 mM de MnCl₂. Una relación mayor corresponde a una Km menor.

²Tasa a 25 μ M de A633dC4P con 20 μ M de dA, dG, dTTP

³Tasa a 10 μ M de Alexa488-O-dA4P, 10 μ M de FAM-Alexa532-O-dG4P, 10 μ M de FAM-Alexa594-O-dT4P, 10 μ M de Alexa633-O-dC4P con 1 mM de MnCl₂. Proporciona una medida tanto para Km como para Vmax, con un conjunto representativo de cuatro análogos nucleotídicos.

⁴Mutación de fondo (si la hay). La polimerasa recombinante corresponde a la polimerasa Phi29 de tipo silvestre más la mutación 1 más la mutación 2.

⁵Marca para inmovilización y/o purificación

Las tasas de unión y liberación de producto se determinaron para las polimerasas Phi29 recombinantes ejemplares con el análogo nucleotídico A594-dT4P usando un ensayo de flujo detenido de FRET como se ilustra esquemáticamente en la figura 7, panel A. Los resultados se representan gráficamente en la figura 7 para Phi29 N62D (panel B), N62D:E375Y (panel C) y N62D:E375W (panel D). Las tasas de liberación de producto se muestran en la tabla 6.

Las polimerasas mutantes E375Y y E375W mostraron tasas aumentadas de unión y liberación de producto, los que indica que utilizan el análogo mejor de lo que lo hace la enzima precursora.

Tabla 6. Tasa de liberación de producto

Enzima	Tasa de liberación de producto
N62D	55 s ⁻¹
N62D:E375Y	117 s ⁻¹
N62D:E375W	76 s ⁻¹

También se determinó la tasa de ramificación relativa (disociación del análogo sin incorporación, es decir, disociación del sustrato) para las polimerasas Phi29 recombinantes ejemplares con el análogo nucleotídico Alexa568-dA4P (también llamado A568-dA4P), usando un ensayo de flujo detenido de FRET como se ilustra esquemáticamente en la figura 8, panel A. En esta técnica, se emplea un molde con un colorante donante de FRET compatible para FRET con el colorante correspondiente sobre el análogo nucleotídico. El cebador tiene una terminación didesoxi en el extremo 3' para evitar la incorporación. El análogo se mezcla previamente con el complejo de enzima-molde-cebador didesoxi. En el aparato de flujo detenido, este complejo preformado se mezcla rápidamente con el nucleótido nativo correspondiente (dATP nativo, en este ejemplo) en exceso, que sirve como una "trampa" para evitar que se vuelva a unir el análogo después de disociarse. El aumento en la fluorescencia del colorante donante se controla como un medio de control de la tasa de disociación/ramificación del análogo.

Los resultados se representan gráficamente en la figura 8 para Phi29 N62D (panel B), N62D:E375Y (panel C) y N62D:E375W (panel D). Las tasas de ramificación se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Tasa de ramificación.

Enzima	Tasa de ramificación
N62D	90 s ⁻¹
N62D:E375Y	31 s ⁻¹
N62D:E375W	43 s ⁻¹

Polimerasas recombinantes ejemplares adicionales

Las polimerasas de la invención pueden incluir una polimerasa Phi29 (u homólogo de la misma) que incluye cualquiera de las mutaciones enumeradas en la tabla 8, individualmente o en combinación con otras mutaciones (por ejemplo, otras mutaciones descritas en este documento). Por ejemplo, las polimerasas de la invención opcionalmente incluyen una polimerasa Phi29 (u homólogo de la misma) que incluye una combinación de mutaciones que se especifican en la tabla 8.

Tabla 8. Mutaciones ejemplares.

D12A E375W T372D
 D12A E375W T372E
 D12A E375W T372R K478D
 D12A E375W T372R K478E
 D12A E375W T372K K478D
 D12A E375W T372K D478E
 D12A E375W K135D
 D12A E375W K135E
 D12A E375W K512D
 D12A E375W K512E
 D12A E375W E408K
 D12A E375W E408R
 D12A E375W T368D L480K
 D12A E375W T368E L480K
 D12A D456N
 N62D D456N
 D12A D456A
 N62D D456A
 D12A D456S
 N62D D456S
 N62D E375M
 N62D E375L
 N62D E375I
 N62D E375F
 N62D E375D
 D12A K512W
 N62D K512W

D12A K512Y
 N62D K512Y
 D12A K512F
 N62D K512F
 D12A E375W K512L
 N62D E375W K512L
 D12A E375W K512Y
 N52D E375W K512Y
 D12A E375W K512F
 N62D E375W K512F
 D12A E375Y K512L
 N62D E375Y K512L
 D12A E375Y K512Y
 N62D E375Y K512Y
 D12A E375Y K512F
 N62D E375Y K512F
 D12A E375W K512H
 N62D E375W K512H
 D12A E375Y K512H
 N62D E375Y K512H
 D12A D510F
 N62D D510F
 D12A D510Y
 N62D D510Y
 D12A D510W
 N62D D510W
 D12A E375W D510F
 N62D E375W D510F
 D12A E375W D510Y
 N62D E375W D510Y
 D12A E375W D510W
 N62D E375W D510W
 D12A E375W D510W K512L
 N62D E375W D510W K512L
 D12A E375W D510W K512F
 N62D E375W D510W K512F
 D12A E375W D510H
 N62D E375W D510H
 D12A E375W D510H K512H
 N62D E375W D510H K512H
 D12A E375W D510H K512F
 N62D E375W D510H K512F
 D12A V509Y
 N62D V509Y
 D12A V509W
 N62D V509W
 D12A V509F
 N62D V509F
 D12A V514Y
 N62D V514Y
 D12A V514W
 N62D V514W
 D12A V514F
 N62D V514F
 D12S
 D12N
 D12Q
 D12K
 D12A
 N62D Y254F
 N62D Y254V
 N62D Y254A
 N62D Y390F
 N62D Y390A
 N62D S252A
 N62D N387A

N62D K157E
 N62D I242H
 N62D Y259S
 N62D G320C
 N62D L328V
 N62D T368M
 N62D T368G
 N62D Y369R
 N62D Y369H
 N62D Y369E
 N62D I370V
 N62D I370K
 N62D K371Q
 N62D T372N
 N62D T372D
 N62D T372R
 N62D T372L
 N62D T373A
 N62D T373H
 N62D S374E
 N62D I378K
 N62D K379E
 N62D K379T
 N62D N387D
 N62D Y405V
 N62D L408D
 N62D G413D
 N62D D423V
 N62D I442V
 N62D Y449F
 N62D D456V
 N62D L480M
 N62D V509K
 N62D V509I
 N62D D510A
 N62D V514I
 N62D V514K
 N62D E515K
 N62D D523T
 N62D H149Y E375W M554S
 M8S N62D M102S H116Y M188S E375W
 N62D M97S E375W
 M8S N62D M97S M102S M188S E375W M554S
 M8A N62D M97A M102A M188A E375W M554A

- Se han descrito previamente unas pocas mutaciones en la polimerasa Phi29. Para la mutación N62D, véase de Vega et al. (1996) "Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of phi29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases" EMBO J. 15(5):1182-92. Para la mutación D12A y mutaciones en las posiciones E14, 66, 165, 169, 12 y 66, y 14 y 66, véase Esteban et al. (1994) "3'→5' exonuclease active site of phi 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism" J Biol Chem. 269(50):31946-54. Para la mutación de S252, véase Blasco et al. (1993) "Phi 29 DNA polymerase active site. Residue ASP249 of conserved amino acid motif 'Dx2SLYP' is critical for synthetic activities" J Biol Chem. 268(32):24106-13. Para la mutación de Y254, véase Blasco et al. (1992) "Phi 29 DNA polymerase active site. Mutants in conserved residues Tyr254 and Tyr390 are affected in dNTP binding" J Biol Chem. 267(27):19427-34. Para la mutación de K371, véase Truniger et al. (2002) "A positively charged residue of phi29 DNA polymerase, highly conserved in DNA polymerases from families A and B, is involved in binding the incoming nucleotide" Nucleic Acids Res. 30(7):1483-92. Para la mutación de K379, véase Truniger et al. (2004) "Two Positively Charged Residues of phi29 DNA Polymerase, Conserved in Protein-primed DNA Polymerases, are Involved in Stabilisation of the Incoming Nucleotide" Journal of Molecular Biology 335(2):481-494. Para la mutación de N387, véase Blasco et al. (1993) "Phi 29 DNA polymerase active site. The conserved amino acid motif 'Kx3NSxYG' is involved in template-primer binding and dNTP selection" J Biol Chem. 268(22):16763-70. Para la mutación de Y390, véase Blasco et al. (1992) "Phi 29 DNA polymerase active site. Mutants in conserved residues Tyr254 and Tyr390 are affected in dNTP binding" J Biol Chem. 267(27):19427-34. Para la mutación de D456, véase Bemad et al. (1990) "The highly conserved amino acid sequence motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in alpha-like DNA polymerases is required by phage phi 29 DNA polymerase for protein-primed initiation and polymerization" Proc Natl Acad Sci USA. 87(12):4610-4.

Ejemplo 4: Un soporte informático para el modelado y ensayo de la cinética enzimática de la ADN polimerasa, que aborda todos los procesos cinéticos y las variables libres simultáneamente.

Las transiciones de estado cinético de la polimerasa se almacenan en una matriz de probabilidades para tramos de tiempo concretos. Un vector de distribuciones de estado probabilísticas puede describir la probabilidad de encontrar una polimerasa particular en varios estados de polimerasa de acuerdo con un modelo de continuidad. La multiplicación de álgebra lineal del vector de distribución de estados con la matriz de probabilidades de transición de estado proporciona un nuevo vector de distribuciones de estado de polimerasa, que describe el efecto del paso del tiempo igual al tramo de tiempo concreto de la matriz de probabilidades de transición de estado.

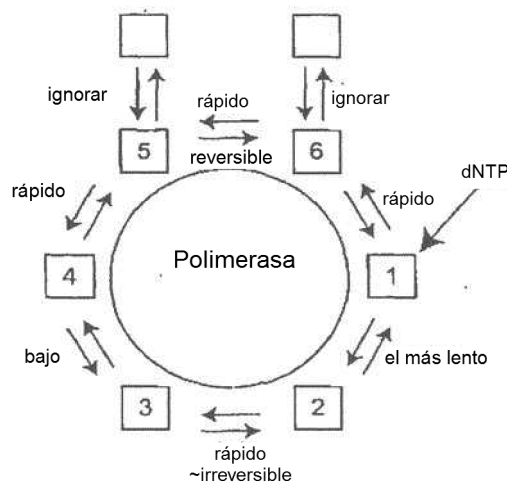
$$\begin{bmatrix} \text{molde 1} \\ \text{molde 2} \\ \vdots \\ \vdots \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} \text{matriz_cinética} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{nuevas} \\ \text{distribuciones} \\ \text{de estado} \end{bmatrix}$$

Generando la matriz de probabilidades de transición de estado para una potencia exponencial particular (por ejemplo, 100), se simula el paso del tiempo de un número particular de tramos de tiempo concretos (por ejemplo, 100 tramos de tiempo). Usando muchos tramos de tiempo concretos se simula la polimerización del ADN. Modelo de estado estacionario.

$$1000 \left\{ \begin{bmatrix} \text{molde 1} \\ \text{molde 2} \\ \vdots \\ \text{molde 1000} \end{bmatrix} \right\}_{656} * \begin{bmatrix} 656 \times 656 \\ \text{matriz_cinética} \end{bmatrix}^{100} = \begin{bmatrix} 1000 \times 656 \\ \text{nuevas} \\ \text{distribuciones} \\ \text{de estado} \end{bmatrix}$$

Las tasas de transición se definen por el usuario. La matriz de probabilidades se genera automáticamente usando la secuencia de molde y las normas de transición de estado codificadas en el soporte. Una diversidad de parámetros, tales como las concentraciones de reactivos, los valores de velocidad cinética y la organización de la matriz de probabilidades pueden variar de los descritos en este ejemplo.

Los siguiente es un ejemplo de un modelo cinético de polimerasa en estado estacionario.



$$R_p = C_6 K_{61} - C_1 K_{16} = C_1 K_{12} - C_2 K_{21}$$

$$\begin{aligned} &= C_2 K_{23} - C_3 K_{32} \\ &= C_3 K_{34} - C_4 K_{43} \\ &= C_4 K_{45} \\ &= C_5 K_{56} - C_6 K_{65} \end{aligned}$$

R_p = tasa de catálisis

C_6 = probabilidad de encontrar la polimerasa en estado 6

K_{61} = tasa de transición de la polimerasa en estado 6 a estado 1

k_{ij} = reacción evaluada

$P_{ij} = k_{ij} \Delta t$ reacción evaluada

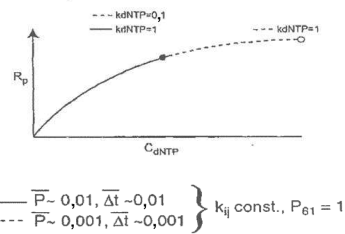
$P_{ij} = i \rightarrow j$ probabilidad

* $K_{54} \approx 0$ como concentración de pirofosfato

$$\downarrow$$

$$R_p = C_6 K_{61} - C_1 K_{16} = \text{tasa de catálisis}$$

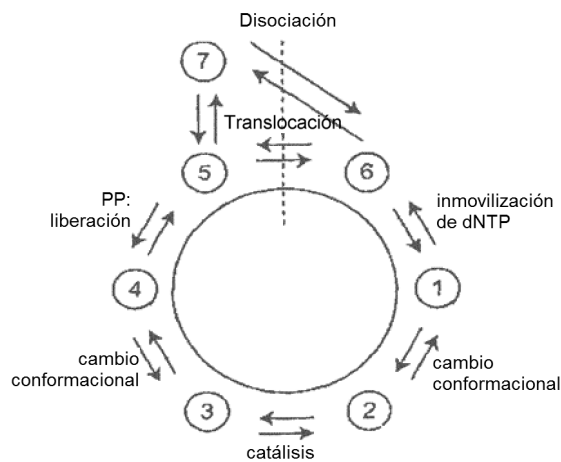
$R_p = (R_p)_{\max}$ @ $K_{61} \rightarrow \infty$, $C_6 \rightarrow 0$ como una condición de concentración de nucleótido creciente hasta saturación
Para encontrar $(R_p)_{\max}$



* Según $\Delta t \downarrow$, se encuentra la asíntota de R_p

Matriz Mega

Los siguiente es una matriz 2-D individual para capturar todos los posibles estados cinéticos de un sistema de polimerasa-molde-dNTP:



Variables				
Estado de la polimerasa	Base del molde	Base nucleot.	Nativo/Análogo	Base nucleot. previa
1-4	A-T	A-T	0-1	A-T
5	A-T	A-T	X	A-T
6	A-T	X	X	A-T
7	A-T	A-T	X	A-T

* Esto produce una matriz de 656 estados, en la que los estados son los siguientes:

1.	1	A	A	0	A
2.	1	A	A	0	C
3.	1	A	A	0	G
4.	1	A	A	0	T
5.	1	A	A	1	A
6.	1	A	A	1	C
7.	1	A	A	1	G
8.	1	A	A	1	T
9.	1	A	C	0	A
652.	7*	T	G	X	T
653.	7*	T	T	X	A
654.	7*	T	T	X	C
655.	7*	T	T	X	G
656.	7*	T	T	X	T
*En este caso, el estado 7 es la disociación de la polimerasa del molde, que opcionalmente puede simplificarse para que no suceda nunca.					

En este caso el molde de ADN es la secuencia repetida (ACGT.) Para un molde más largo, la secuencia repetida tendrá proporcionalmente más estados, en la medida que la secuencia repetida del molde más largo no contenga la secuencia de molde original. Por ejemplo, la matriz de transición de probabilidades generada para la secuencia

...[ACGT]ACGT...

sería equivalente a la matriz generada para la secuencia

...[ACGTACGT]ACGT....

Sin embargo, la matriz de transición de probabilidades generada para la secuencia

...[AACCGGTT]AACC...

sería diferente, ya que contiene muchas transiciones de estado no permitidas en la matriz original (por ejemplo, translocación de la polimerasa de una "A" a otra "A" en la secuencia de molde. Además, como esta secuencia repetida contiene ocho bases de Watson-Crick en lugar de cuatro, generaría una matriz de 1312 estados en lugar de 656.

Algunos estados no requieren que se definan todas las variables (véase la tabla anterior). Por ejemplo, las características de un nucleótido que aún no se ha incorporado en el estado 6 no afecta a la identidad del estado 6.

577.	6	A	X	X	A
------	---	---	---	---	---

* La tasa de transición entre dos estados se definirá tal cual:

562.	5	T	A	X	C
------	---	---	---	---	---

$$P_{56TAXC} = k_{56TAXC} * \text{tramo_de tiempo}$$

En la que P_{56TAXC} es la probabilidad de que la polimerasa complete la translocación del 5 al estado 6 con las condiciones adicionales de nucleótido-molde descritas por "TAXC". k_{56TAXC} es la tasa de transición de esta translocación.

Actualmente en este sistema de 656 estados, hay 1568 tasas de transición a definir. Hay varias aproximaciones que pueden hacerse para reducir la cantidad de entradas que necesita introducir el usuario.

Las siguientes combinaciones pueden tratarse de forma equivalente en todas las transiciones de estado:

Nucleótido del molde: ACGT
TGCA

Asimismo, todos los emparejamiento incorrectos pueden tratarse igual

$$K_{12AT0A} = k_{12xZ0Z}$$

$$K_{12CG0T} = k_{12xZ0Z}$$

$$K_{12CT0T} = k_{12xY0Z}$$

$$K_{12CT1C} = k_{12xY1Y}$$

X = cualquier variable

Y = cualquier emparejamiento incorrecto

Z = cualquier emparejamiento

De esta manera, la selección de entrada del usuario se reduce a -100 variables de tasa de transición única. Todas las tasas definidas de forma explícita se asignan automáticamente a las entradas del usuario apropiadas.

Construcción de matriz Mega

nuevo estado

	nuevo estado			
	1.	2.	3.	4.
estado actual	1.		.	
	2.		.	.
	3.		.	.
	4.	.	.	.

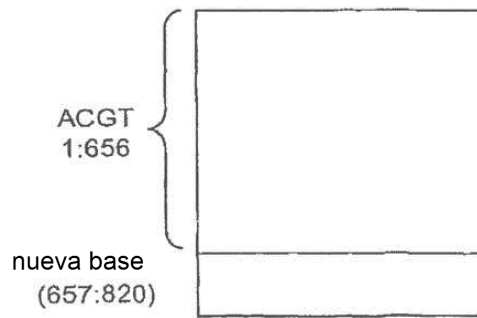
Para sacar provecho de la simetría con el fin de insertar tasas de transición definidas por el usuario en la matriz automáticamente, puede cambiarse la organización de la matriz de 656 estados:

Antigua					
1.	1	A	A	O	A
2.	1	A	A	O	C
...	...	...	...	...	...
656.	7	T	T	1	T

Nueva					
1.	A	1	A	O	A
2.	A	1	A	O	C
...	...	...	...	...	...
656.	T	7	T	1	T

Esto tiene dos ventajas:

(1.) el molde puede prolongarse únicamente con ligeras modificaciones a la matriz. Cada base del molde en la secuencia repetida conlleva 164 estados adicionales. Anteriormente, los nuevos estados tendrían que entretenerse en la matriz.



(2) La matriz tiene un mayor grado de simetría que antes, lo que hace que sea más fácil construir la matriz usando código automatizado:

```
para ii = 1:164
eval(['...']);
% final ii
```

Siete instrucciones "eval" (una función que evalúa un comando construido de forma artificial) construyen siete estados de polimerasa.

Esto se ha potenciado adicionalmente para construir la matriz para cualquier secuencia de molde dada automáticamente.

Una automatización adicional de la generación de la matriz de probabilidades de transición de estado es a través de la construcción de una matriz de concentración, que contiene las concentraciones de todos los reactivos relevantes (polimerasa, molde, nucleótidos, etc.). Esta matriz de concentración completa la matriz de transición de estado de modo que (en el límite de concentración lineal).

```
matriz_cinética = matriz_transición_velocidad.* matriz_conc
```

```
matriz_probabilidades_transición_estado = matriz_cinética * tramo_tiempo
```

en la que cada elemento de la matriz de transición de velocidad se ha multiplicado por su variable dependiente correspondiente en la matriz de concentración. De esta manera, se capturan las transiciones de estado dependientes de la concentración (por ejemplo, la tasa de incorporación de nucleótidos depende de la concentración de nucleótidos). Los elementos de la matriz que no dependen de la concentración no se cambian. Las dependencias no lineales en la concentración puede abordarse usando una fórmula no lineal que define la matriz cinética.

Lo siguiente describe la matriz de probabilidades de transición de estado:



```
Matriz = zeros(656,656);
Matriz(1, [1,139,577]) = [1-p12AA0A - p16AA0A, p12AA0A, p16AA0A];
Matriz(2, [2,130,578]) = [1-p12AA0C - p16AA0C, p12AA0C, p16AA0C];
....
Matriz(129, [129,257,1]) = [1-p23AA0A - p21AA0A, p23AA0A, p21AA0A];
....
Matriz(656, [656,580,576]) = [1-p76TTxT - p75TTxT, p76TTxT, p75TTxT];
```

en las que cada uno de los valores de probabilidad insertado en la matriz se ha calculado usando las tasas de transición definidas por el usuario, los valores de concentración y un tramo de tiempo concreto. Obsérvese que el primer elemento de una fila es la probabilidad de no tener transición entre los estados y es, por tanto, la diferencia entre un 100 % y las probabilidades de todas las transiciones de estado de ese estado particular.

Aumento de la eficacia de simulación:

Generando la matriz de probabilidades de transición de estado para una potencia exponencial particular (por ejemplo, 100), se simula el paso del tiempo de un número particular de tramos de tiempo concretos (por ejemplo, 100 tramos de tiempo).

Pueden hacerse mejoras adicionales a la eficacia de la simulación a través de la vectorización de muchos complejos de polimerasa-molde simultáneamente.

$$1000 \left\{ \begin{array}{c} \text{molde 1} \\ \text{molde 2} \\ \vdots \\ \text{molde 1000} \end{array} \right\} \begin{array}{c} \text{656} \\ \text{656} \\ \vdots \\ \text{656} \end{array} * \begin{bmatrix} 656 \times 656 \\ \text{matriz_cinética} \end{bmatrix}^{100} = \begin{bmatrix} 1000 \times 656 \\ \text{nuevas} \\ \text{distribuciones} \\ \text{de estado} \end{bmatrix}$$

Límite de velocidad: La síntesis de ADN puede rastrearse observando donde está la polimerasa sobre el molde.



[1000] = "A"
= "C"
etc.

Si nos movemos demasiado rápido (es decir, demasiados tramos de tiempo en la matriz de transición exponencial), la polimerasa puede ir de "A" directo a "G", haciendo que no esté claro si era una translocación directa o inversa. Por lo tanto, se establece un límite de error ($\sim 1e-6$) que define un factor de tiempo exponencial sobre la matriz_cinética. El límite de velocidad es tal que ni la probabilidad de translocación inversa de "A" a "G" ni la probabilidad de translocación directa de "A" a "T" excede el límite de la tasa de error. Una secuencia repetida de ADN más larga nos permitirá movernos más rápido, pero una secuencia repetida que sea demasiado larga será intensa de forma computacional.

Una aplicación adicional de este programa puede ser la simulación de la tasa de consumo de reactivo. Moviéndose a tamaño de tramo muy grandes, se simula el movimiento de la polimerasa a lo largo del molde. Esta estrategia usa únicamente un molde en una distribución continua de estados (en lugar de 1000⁺ moldes en estados concretos). Esto rastrea el consumo de reactivo a lo largo del tiempo.

Se encuentra el cambio de concentración de reactivos basándose en la población actual del sistema y basándose en las constantes de velocidad de transición:

$$\begin{aligned} d(\text{dTAP}_o)_{\text{per pol}} &= C_1 \Delta t k_{16AA0A} + C_2 \Delta t k_{16AA0C} + \dots C_{520} \Delta t k_{16TT0T} \\ &- C_{145} \Delta t k_{61AA0A} - C_{146} \Delta t k_{61AA0C} - \dots = C_{1p} \Delta t k_{61AA0A} + C_{146} \Delta t k_{61AA0C} + \dots \\ &- C_{145} \Delta t k_{61AA0A} - C_{146} \Delta t k_{61AA0C} - \dots \end{aligned}$$

En las que estas probabilidades son durante un tramo de tiempo de $1e^6$ segundos de la matriz_cinética:

cambio de concentración (molar) de reactivo dTAP (nativo) en 1 ciclo cerrado donde el tiempo transcurrido = $\text{núm_etapas} * 1e^6$ segundos

5

$$[\text{matriz_rápida}] = [\text{matriz_cinética}]^{\text{núm_etapas}}$$

$$\frac{\Delta C_{\text{max}}}{C} < 1\% ?$$

límite de velocidad:

10

$$\text{matriz_rápida} = \text{matriz_cinética}^n$$

Según N se va haciendo más grande, el ajuste a las concentraciones en cada ciclo cerrado se hace más grande e impreciso. Esto se usa para establecer un factor de tiempo exponencial sobre la matriz_cinética. Véase la figura 9, que representa el tamaño de salto de la matriz cinética frente a la bajada de concentración.

15

Incluso aceptando que $\text{núm_etapas} = 1e6$ puede proporcionar curvas de concentración "suficientemente" precisas (véase la estrategia para suavizar según disminuye el tamaño del tramo).

El resultante (matriz doble 4096 x 4096 es un límite de memoria razonable).

20

Una aplicación adicional de este programa puede ser a estimación de la fracción de emparejamiento incorrecto de la polimerasa usando un modelo de continuidad o un modelo de recuento. Actualmente, se dice que el 2.º par de molde - nucleótido previo es siempre un emparejamiento. (Esto es para reducir el tamaño de la matriz 4x... el error debe ser pequeño salvo que haya mucha actividad exonucleasa).

25

Por lo tanto, cualquier translocación directa del estado 5 con un emparejamiento incorrecto previo se convierte en un emparejamiento incorrecto permanente (únicamente no lo parecerá si se retrocede).

30

$$\text{tasa de translocación total directa} = C_5 \cdot C_6 - C_6 \cdot k_{65}$$

$$\text{reacción} = (\text{tasa de emparejamiento incorrecto}) / (\text{tasa total})$$

35

C_5 representa la concentración de todos los estados de la matriz con la polimerasa en estado 5 (véase pg. 128)
 k_{56} es el conjunto completo de todas las tasas correspondientes para la translocación directa

$$\text{translocación directa de emparejamiento incorrecto} = C_5^{(m)} \cdot k_{56}^{(m)} - C_6^{(m)} \cdot k_{65}^{(m)}$$

40

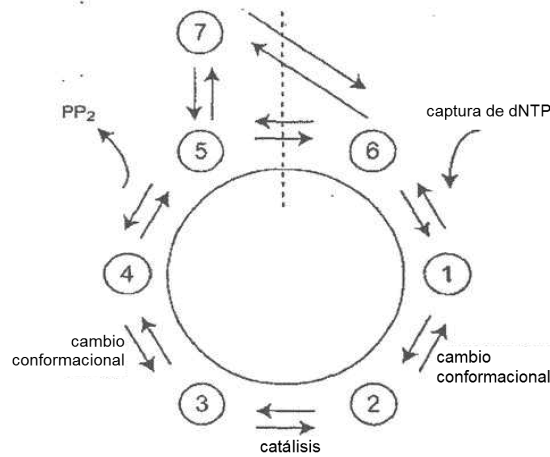
(En la translocación inversa, nunca se finalizará en el estado 5 de la polimerasa con emparejamiento incorrecto previo, véase anteriormente).

45

También se puede generar un modelo de recuento que cuenta la cantidad de complejos de polimerasa/molde que tienen emparejamiento incorrecto de molde/nucleótido previo y que también hacen la translocación directa (haciendo el emparejamiento incorrecto permanente), y lo promedian sobre toda la polimerasa para obtener una fracción de emparejamiento incorrecto. Esta debe estar en la misma aproximación que la estimación del modelo de continuidad anterior.

50

1) Primero se establecen todas las constantes de velocidad igual a la polimerasa T7 como se muestra por Patel, et al. (1991) "Pre-Steady-State Kinetic Analysis of Processive DNA Replication Including Complete Characterization of an Exonuclease-Deficient Mutant" Biochemistry 30:511-525.



Constantes de velocidad específicas, etc.

- 5 $K_{61} \geq 50 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{12} = 300 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{23} \geq 9000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{34} = 1200 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{645} \geq 1000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
10 $K_{16} \geq 1000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{21} = 100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{32} = 18\,000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{43} = 18 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $K_{54} \geq 0,5 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
15 $(V_{\text{max}})_{\text{nativo}} = 50 \text{ pb}$
 $(V_{\text{max}})_{\text{análogo}} = 5 \text{ pb}$
 $(k_{\text{m}})_{\text{nativo}} = 0,2 \mu\text{m}$
 $(k_{\text{m}})_{\text{análogo}} = 6 \mu\text{m}$
- 20 2) Usando la saturación de la concentración de dNTP ($\geq 1 \text{ mM}$), se establece la $V_{\text{max}} = 50 \text{ pb}$ cambiando k_{12} (principalmente) y otras constantes de velocidad (si fuera necesario). Se mantienen todas las tasas de transición de análogo iguales a las tasas de transición de dNTP nativos. Por ahora se interrumpe la disociación (tasa $\rightarrow 0$)
- 25 3) Usando la saturación de la concentración del análogo-dNTP ($\geq 1 \text{ mM}$), se establece la $V_{\text{max}} = 5 \text{ pb}$ cambiando k_{45} para los análogos únicamente.
- 4) Se establece $(k_{\text{m}})_{\text{nativo}} = 0,2 \mu\text{m}$ estableciendo la concentración de dNTP nativo a $0,2 \mu\text{m}$ y cambiando k_{61} (nativos únicamente) de modo que $V = 25 \text{ pb}$.
- 30 5) Se establece $(k_{\text{m}})_{\text{nativo}} = 6 \mu\text{m}$ estableciendo la concentración de dNTP análogo a $6 \mu\text{m}$ y cambiando k_{61} (análogos únicamente) de modo que $V = 2,5 \text{ pb}$.
- 35 dNTP nativos
 $k_{61} = 365 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{12} = 60 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{23} = 9000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{34} = 1200 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{45} = 1000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{56} = 500 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{16} = 10 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{21} = 100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{32} = 1800 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{43} = 18 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{54} = 0,5 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{65} = 100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
45 dNTP análogos
 $k_{61} = 1,1 \mu\text{m} \text{s}^{-1}$
 $k_{12} = 60 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{23} = 9000 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
 $k_{34} = 5,5 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$
- 50

$$\begin{aligned}
 k_{45} &= 5,5 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1} \\
 k_{56} &= 500 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1} \\
 k_{16} &= 10 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1} \\
 k_{21} &= 100 \mu\text{m} \text{s}^{-1} \\
 k_{32} &= 1800 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1} \\
 k_{43} &= 18 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1} \\
 k_{54} &= 0,1 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1} \\
 k_{65} &= 100 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}
 \end{aligned}$$

- 10 Todas las tasas se someterán a calibración por futuros experimentos también. pol_índice.
 m: Inicializa todas las listas de índice de matriz necesarias y punteros basándose en la secuencia de ADN.
 Pol_matriztasa.m: Recoge el archivo Excel como entrada, que contiene una lista de todas las constantes de
 velocidad únicas, produce la matriz de tasas de transición basándose en la secuencia de ADN.
 Pol_matrizconc.m: Recoge las concentraciones de reactivos, compone la matriz de concentración de manera que:

$$15 \quad \text{Matriz de probabilidades} = \text{tramo_tiempo} * \text{matriz_tasas} * \text{matriz_conc}$$

(para todos los elementos con diagonales)

- Pol_dntp_consumo.m: Calcula las tasas de consumo de reactivo basándose en el modelo de continuidad.
 20 POL_adn.m: Combina todas las funciones anteriores de POL_ADN, POL_REACTIVOS, POL_MAPACURVA.
 rastrea todo el consumo anterior,
 rastrea la distribución de longitud de la síntesis de ADN,
 rastrea el molde libre, el molde de ADNbc completado, el molde que sobre el que se está trabajando en el momento,
 múltiples ejecuciones de concentración posibles
 25 secuencia de ADN repetitiva definida por el usuario, molde de longitud finita
 pol_metal.m: Realización completa de experimento de reducción de Mg⁺, usando la versión concentrada POL ADN.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle con fines de claridad y comprensión, estará claro para
 30 los expertos en la materia, a partir de la lectura de esta divulgación, que pueden hacerse diversos cambios en la
 forma y el detalle sin alejarse del verdadero alcance de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos
 descritos anteriormente pueden usarse en diversas combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> PACIFIC BIOSCIENCES OF CALIFORNIA, INC.
 <120> POLIMERASAS PARA LA INCORPORACIÓN DE ANÁLOGOS NUCLEOTÍDICOS
 <130> SJK/FP7171499
 40 <140> TBC
 <141> 21/12/2006
 <150> EP 06848948.3
 45 <151> 21/12/2006
 <150> PCT/US2006/049122
 <151> 21/12/2006
 50 <150> US 11/645.223
 <151> 21/12/2005
 <160> 64
 55 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 575
 <212> PRT
 60 <213> Bacteriófago phi-29
 <400> 1

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 2
 <211> 862
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante N62D marcada con GST, His y S

<400> 2

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1                               5                     10           15

```

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Asp Asp Asp Asp Lys Ser Pro Met Gly Tyr Arg Gly Ser Glu Phe Met
 275 280 285
 Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr
 290 295 300
 Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu
 305 310 315 320
 Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala
 325 330 335
 Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asp Leu Lys Phe
 340 345 350
 Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp
 355 360 365
 Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met
 370 375 380
 Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg
 385 390 395 400
 Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro
 405 410 415
 Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp
 420 425 430
 Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu
 435 440 445
 Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala Leu
 450 455 460
 Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys
 485 490 495
 Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala
 500 505 510
 Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu
 515 520 525

ES 2 648 313 T3

Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln
 530 535 540

Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly
 545 550 555 560

Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg
 565 570 575

Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys
 580 585 590

Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly
 595 600 605

Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys
 610 615 620

Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe
 625 630 635 640

Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr
 645 650 655

Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met
 660 665 670

Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly
 675 680 685

Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly
 690 695 700

Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile
 705 710 715 720

Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr
 725 730 735

Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
 740 745 750

Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
 755 760 765

Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln

ES 2 648 313 T3

770

775

780

Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu
785 790 795 800

Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys
805 810 815

Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
820 825 830

Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
835 840 845

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

<210> 3

<211> 862

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polimerasa Phi29 mutante K135A-N62D marcada con GST, His y S

<400> 3

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

370		375		380
Gly 385	Gln	Trp	Tyr	Met 390
	Ile	Asp	Ile	Cys
	Leu	Gly 395	Tyr	Lys
			Gly	Lys
				Arg 400
Lys	Ile	His	Thr	Val 405
	Ile	Tyr	Asp	Ser
				Leu 410
			Lys	Lys
			Leu	Pro
				Phe 415
Val	Lys	Lys	Ile	Ala 420
	Ala	Ala	Asp	Phe
			Lys	Leu 425
			Thr	Val
			Leu	Lys
				Gly 430
				Asp
Ile	Asp	Tyr	His	Lys
				Glu 435
				Arg
				Pro 440
				Val
				Gly
				Tyr
				Lys
				Ile 445
				Thr
				Pro
				Glu
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile
				Lys
				Asn 455
				Asp
				Ile
				Gln
				Ile
				Ile 460
				Ala
				Glu
				Ala
				Leu
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys
				Gln 470
				Gly
				Leu
				Asp
				Arg
				Met 475
				Thr
				Ala
				Gly
				Ser
				Asp 480
Ser	Leu	Lys	Gly	Phe
				Lys 485
				Asp
				Ile
				Ile 490
				Thr
				Thr
				Lys
				Lys
				Phe
				Lys 495
				Lys
Val	Phe	Pro	Thr	Leu
				Ser 500
				Leu
				Gly
				Leu 505
				Asp
				Lys
				Glu
				Val
				Arg 510
				Tyr
				Ala
Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe
				Thr 515
				Trp
				Leu 520
				Asn
				Asp
				Arg
				Phe
				Lys 525
				Glu
				Lys
				Glu
Ile	Gly	Glu	Gly	Met
				Val 530
				Phe
				Asp 535
				Val
				Asn
				Ser
				Leu 540
				Tyr
				Pro
				Ala
				Gln
Met	Tyr	Ser	Arg	Leu
				Leu 550
				Pro
				Tyr
				Gly
				Glu 555
				Pro
				Ile
				Val
				Phe
				Glu
				Gly 560
Lys	Tyr	Val	Trp	Asp
				Glu 565
				Asp
				Tyr
				Pro
				Leu 570
				His
				Ile
				Gln
				His
				Ile 575
				Arg
Cys	Glu	Phe	Glu	Leu
				Lys 580
				Lys
				Glu
				Gly
				Tyr 585
				Ile
				Pro
				Thr
				Ile
				Gln 590
				Ile
				Lys
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr
				Lys 595
				Lys
				Gly
				Asn 600
				Glu
				Tyr
				Leu
				Lys
				Ser 605
				Ser
				Gly
				Gly
Glu	Ile	Ala	Asp	Leu
				Trp 610
				Leu
				Ser
				Asn
				Val
				Asp
				Leu 620
				Glu
				Leu
				Met
				Lys

ES 2 648 313 T3

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

<210> 4
 <211> 862
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante E375H-N62D marcada con GST, His y S

<400> 4

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Gly	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Val	Pro	Arg	225		230		235						240
Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu		245		250						255	
Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		260		265						270	
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Met	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ser	Glu	Phe	Met	275		280						285		
Lys	His	Met	Pro	Arg	Lys	Met	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	290		295					300			
Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Arg	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Met	Asn	Ile	Glu	305		310			315					320
Asp	His	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Met	Ala		325		330						335	
Trp	Val	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe	His	Asp	Leu	Lys	Phe		340		345					350		
Asp	Gly	Ala	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe	Lys	Trp		355		360				365			
Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Arg	Met	370		375				380				
Gly	Gln	Trp	Tyr	Met	Ile	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	385		390			395					400
Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro		405		410						415	
Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp		420		425					430		
Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu		435		440				445			
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	450		455				460				
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	465		470			475					480

ES 2 648 313 T3

Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys
 485 490 495
 Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala
 500 505 510
 Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu
 515 520 525
 Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln
 530 535 540
 Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly
 545 550 555 560
 Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg
 565 570 575
 Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys
 580 585 590
 Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly
 595 600 605
 Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys
 610 615 620
 Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe
 625 630 635 640
 Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr
 645 650 655
 Ile Lys Thr Thr Ser His Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met
 660 665 670
 Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly
 675 680 685
 Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly
 690 695 700
 Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile
 705 710 715 720
 Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr
 725 730 735

ES 2 648 313 T3

Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
740 745 750

Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
755 760 765

Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln
770 775 780

Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu
785 790 795 800

Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys
805 810 815

Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
820 825 830

Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
835 840 845

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

<210> 5
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante E375S-N62D marcada con GST, His y S

<400> 5

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

ES 2 648 313 T3

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Gly Ser Thr Ser
210 215 220

Gly Ser Gly His His His His His His Ser Ala Gly Leu Val Pro Arg
225 230 235 240

Gly Ser Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu
245 250 255

Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Asp Asp Asp Asp Lys Ser Pro Met Gly Tyr Arg Gly Ser Glu Phe Met
275 280 285

Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr
290 295 300

Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu
305 310 315 320

Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala
325 330 335

ES 2 648 313 T3

Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asp Leu Lys Phe
 340 345 350
 Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp
 355 360 365
 Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met
 370 375 380
 Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg
 385 390 395 400
 Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro
 405 410 415
 Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp
 420 425 430
 Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu
 435 440 445
 Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala Leu
 450 455 460
 Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys
 485 490 495
 Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala
 500 505 510
 Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu
 515 520 525
 Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln
 530 535 540
 Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly
 545 550 555 560
 Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg
 565 570 575
 Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys

ES 2 648 313 T3

580				585				590										
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly			
		595																
Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys			
		610																
Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe			
		625			630											640		
Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr			
				645											655			
Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met			
				660											670			
Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly			
		675																
Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly			
		690			710			715								720		
Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile			
																		720
Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr			
				725											735			
Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr			
				740			745									750		
Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	Gly			
				755			760									765		
Tyr	Trp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Arg	Gln			
						775										780		
Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Lys	Leu			
						790			795								800	
Val	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Lys			
				805											815			
Cys	Ala	Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Asn			
				820			825									830		

ES 2 648 313 T3

Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
835 840 845

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

5 <210> 6
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polimerasa Phi29 mutante E375K-N62D marcada con GST, His y S

<400> 6

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr

ES 2 648 313 T3

			180						185						190					
Leu	Lys	Ser 195	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala 200	Trp	Pro	Leu	Gln	Gly 205	Trp	Gln	Ala					
Thr	Phe 210	Gly	Gly	Gly	Asp	His 215	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp 220	Gly	Ser	Thr	Ser					
Gly 225	Ser	Gly	His	His	His 230	His	His	His	Ser	Ala 235	Gly	Leu	Val	Pro	Arg 240					
Gly	Ser	Thr	Ala	Ile 245	Gly	Met	Lys	Glu	Thr 250	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu					
Arg	Gln	His	Met 260	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu 265	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly 270	Ser	Gly					
Asp	Asp	Asp 275	Asp	Lys	Ser	Pro	Met 280	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ser 285	Glu	Phe	Met					
Lys	His 290	Met	Pro	Arg	Lys	Met 295	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe 300	Glu	Thr	Thr	Thr					
Lys 305	Val	Glu	Asp	Cys	Arg 310	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly 315	Tyr	Met	Asn	Ile	Glu 320					
Asp	His	Ser	Glu	Tyr 325	Lys	Ile	Gly	Asn 330	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Met 335	Ala					
Trp	Val	Leu	Lys 340	Val	Gln	Ala	Asp	Leu 345	Tyr	Phe	His	Asp	Leu 350	Lys	Phe					
Asp	Gly	Ala 355	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp 360	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly 365	Phe	Lys	Trp					
Ser	Ala 370	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn 375	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile 380	Ile	Ser	Arg	Met					
Gly 385	Gln	Trp	Tyr	Met	Ile 390	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly 395	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg 400					
Lys	Ile	His	Thr 405	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu 410	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe 415	Pro					
Val	Lys	Lys	Ile 420	Ala	Lys	Asp	Phe 425	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp					

ES 2 648 313 T3

Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu
435						440						445			
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu
450						455				460					
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp
465				470						475				480	
Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys
				485				490						495	
Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala
		500						505				510			
Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	Glu
		515				520						525			
Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gln
530						535				540					
Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	Gly
545				550						555				560	
Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	Arg
				565				570						575	
Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys
		580						585				590			
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly
		595				600						605			
Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys
610						615				620					
Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe
625				630						635				640	
Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr
				645				650						655	
Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met
		660						665				670			
Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly
675		680				685						685			

ES 2 648 313 T3

Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly
690 695 700

Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile
705 710 715 720

Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr
725 730 735

Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
740 745 750

Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
755 760 765

Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln
770 775 780

Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu
785 790 795 800

Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys
805 810 815

Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
820 825 830

Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
835 840 845

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

<210> 7
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante E375R-N62D marcada con GST, His y S

<400> 7

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Lys	His	Met	Pro	Arg	Lys	Met	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	290	295	300
Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Arg	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Met	Asn	Ile	Glu	305	310	315
Asp	His	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Met	Ala	325	330	335
Trp	Val	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe	His	Asp	Leu	Lys	Phe	340	345	350
Asp	Gly	Ala	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe	Lys	Trp	355	360	365
Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Arg	Met	370	375	380
Gly	Gln	Trp	Tyr	Met	Ile	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	385	390	395
Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro	405	410	415
Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	420	425	430
Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu	435	440	445
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	450	455	460
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	465	470	475
Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	485	490	495
Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala	500	505	510
Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	Glu	515	520	525
Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gln	530	535	540

ES 2 648 313 T3

Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	Gly	545	550	555	560
Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	Arg	565	570	575	
Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys	580	585	590	
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	595	600	605	
Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys	610	615	620	
Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	625	630	635	640
Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr	645	650	655	
Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	660	665	670	
Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly	675	680	685	
Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	690	695	700	
Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile	705	710	715	720
Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr	725	730	735	
Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr	740	745	750	
Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	Gly	755	760	765	
Tyr	Trp	Ala	His	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Arg	Gln	770	775	780	
Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Lys	Leu				

ES 2 648 313 T3

785						790						795						800
Val	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Lys			
				805					810					815				
Cys	Ala	Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Asn			
			820					825					830					
Phe	Lys	Val	Gly	Phe	Ser	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Lys	Pro	Val	Gln	Val			
		835					840					845						
Pro	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Asp	Asp	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys					
	850					855					860							

<210> 8
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante L384R-N62D marcada con GST, His y S
<400> 8

Met	Ser	Pro	Ile	Leu	Gly	Tyr	Trp	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
1			5					10						15	
Thr	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Glu	His	Leu
		20					25					30			
Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Trp	Arg	Asn	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu
	35					40					45				
Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Lys
	50				55					60					
Leu	Thr	Gln	Ser	Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp	Lys	His	Asn
65				70				75						80	
Met	Leu	Gly	Gly	Cys	Pro	Lys	Glu	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu
			85					90						95	
Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser
		100					105						110		
Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu
	115					120					125				
Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
	130				135					140					

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

385		390		395		400									
Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro
				405					410					415	
Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp
			420					425					430		
Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu
		435					440					445			
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu
	450					455					460				
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp
465					470					475					480
Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys
				485					490					495	
Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala
			500					505					510		
Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	Glu
		515					520					525			
Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gln
	530					535					540				
Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	Gly
545					550					555					560
Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	Arg
				565					570					575	
Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys
			580					585					590		
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly
		595					600					605			
Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys
	610					615					620				
Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe
625					630					635					640

ES 2 648 313 T3

Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr
 645 650 655
 Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Arg Met
 660 665 670
 Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly
 675 680 685
 Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly
 690 695 700
 Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile
 705 710 715 720
 Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr
 725 730 735
 Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
 740 745 750
 Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
 755 760 765
 Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln
 770 775 780
 Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu
 785 790 795 800
 Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys
 805 810 815
 Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
 820 825 830
 Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
 835 840 845
 Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 850 855 860

<210> 9
 <211> 862
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante E486A-N62D marcada con GST, His y S

<400> 9

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	245	250	255
Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	260	265	270
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Met	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ser	Glu	Phe	Met	275	280	285
Lys	His	Met	Pro	Arg	Lys	Met	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	290	295	300
Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Arg	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Met	Asn	Ile	Glu	305	310	315
Asp	His	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Met	Ala	325	330	335
Trp	Val	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe	His	Asp	Leu	Lys	Phe	340	345	350
Asp	Gly	Ala	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe	Lys	Trp	355	360	365
Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Arg	Met	370	375	380
Gly	Gln	Trp	Tyr	Met	Ile	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	385	390	395
Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro	405	410	415
Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	420	425	430
Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu	435	440	445
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	450	455	460
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	465	470	475
Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	485	490	495

ES 2 648 313 T3

Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala			
			500					505					510					
Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	Glu			
		515					520					525						
Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gln			
	530					535					540							
Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	Gly			
545					550					555					560			
Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	Arg			
				565					570					575				
Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys			
			580					585					590					
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly			
		595					600					605						
Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	Lys			
	610					615					620							
Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe			
625					630					635					640			
Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr			
				645					650					655				
Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Met			
			660					665					670					
Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	Gly			
		675					680					685						
Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly			
	690					695					700							
Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	Ile			
705					710					715					720			
Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	Tyr			
				725					730					735				
Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Thr			
			740					745					750					

ES 2 648 313 T3

Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
755 760 765

Tyr Trp Ala His Ala Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln
770 775 780

Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu
785 790 795 800

Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys
805 810 815

Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
820 825 830

Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
835 840 845

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

<210> 10
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante E486D-N62D marcada con GST, His y S
<400> 10

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

ES 2 648 313 T3

Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser	100	105	110	
Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu	115	120	125	
Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	130	135	140	
Gly	Asp	His	Val	Thr	His	Pro	Asp	Phe	Met	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	145	150	155	160
Val	Val	Leu	Tyr	Met	Asp	Pro	Met	Cys	Leu	Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Leu	165	170	175	
Val	Cys	Phe	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Pro	Gln	Ile	Asp	Lys	Tyr	180	185	190	
Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Pro	Leu	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	195	200	205	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Ser	210	215	220	
Gly	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Val	Pro	Arg	225	230	235	240
Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	245	250	255	
Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	260	265	270	
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Met	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ser	Glu	Phe	Met	275	280	285	
Lys	His	Met	Pro	Arg	Lys	Met	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	290	295	300	
Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Arg	Val	Trp	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Met	Asn	Ile	Glu	305	310	315	320
Asp	His	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Met	Ala	325	330	335	
Trp	Val	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Asp	Leu	Tyr	Phe	His	Asp	Leu	Lys	Phe	340	345	350	

ES 2 648 313 T3

Asp	Gly	Ala	Phe	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Phe	Lys	Trp	355	360	365	
Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Thr	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Arg	Met	370	375	380	
Gly	Gln	Trp	Tyr	Met	Ile	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Arg	385	390	395	400
Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	Pro	405	410	415	
Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	420	425	430	
Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu	435	440	445	
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	450	455	460	
Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Asp	465	470	475	480
Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	Lys	485	490	495	
Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	Ala	500	505	510	
Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	Glu	515	520	525	
Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gln	530	535	540	
Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	Gly	545	550	555	560
Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	Arg	565	570	575	
Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Lys	580	585	590	
Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly				

ES 2 648 313 T3

595		600		605
Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys				
610		615		620
Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe				
625		630		635
Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr				
		645		650
Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met				
		660		665
Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly				
		675		680
Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly				
		690		695
Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile				
705		710		715
Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr				
		725		730
Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr				
		740		745
Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly				
		755		760
Tyr Trp Ala His Asp Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln				
		770		775
Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu				
785		790		795
Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys				
		805		810
Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn				
		820		825
Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val				
		835		840
				845

ES 2 648 313 T3

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

5 <210> 11
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polimerasa Phi29 mutante K512A-N62D marcada con GST, His y S
<400> 11

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala Leu
 450 455 460
 Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys
 485 490 495
 Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala
 500 505 510
 Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu
 515 520 525
 Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln
 530 535 540
 Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly
 545 550 555 560
 Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg
 565 570 575
 Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys
 580 585 590
 Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly
 595 600 605
 Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys
 610 615 620
 Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe
 625 630 635 640
 Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr
 645 650 655
 Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met
 660 665 670
 Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly
 675 680 685
 Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly
 690 695 700

ES 2 648 313 T3

Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile
705 710 715 720

Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr
725 730 735

Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
740 745 750

Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
755 760 765

Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln
770 775 780

Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Ala Leu
785 790 795 800

Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys
805 810 815

Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
820 825 830

Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
835 840 845

Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
850 855 860

<210> 12
<211> 845
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante N62D marcada con GST, His y S con eliminación de los restos 505-525

<400> 12

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

ES 2 648 313 T3

Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Lys	50	55	60
Leu	Thr	Gln	Ser	Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp	Lys	His	Asn	65	70	75
Met	Leu	Gly	Gly	Cys	Pro	Lys	Glu	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	85	90	95
Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser	100	105	110
Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu	115	120	125
Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	130	135	140
Gly	Asp	His	Val	Thr	His	Pro	Asp	Phe	Met	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	145	150	155
Val	Val	Leu	Tyr	Met	Asp	Pro	Met	Cys	Leu	Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Leu	165	170	175
Val	Cys	Phe	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Pro	Gln	Ile	Asp	Lys	Tyr	180	185	190
Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Pro	Leu	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	195	200	205
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Ser	210	215	220
Gly	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Val	Pro	Arg	225	230	235
Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	245	250	255
Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	260	265	270
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Met	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ser	Glu	Phe	Met	275	280	285
Lys	His	Met	Pro	Arg	Lys	Met	Tyr	Ser	Cys	Asp	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	290	295	300

ES 2 648 313 T3

Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu
 305 310 315 320
 Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala
 325 330 335
 Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asp Leu Lys Phe
 340 345 350
 Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp
 355 360 365
 Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met
 370 375 380
 Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg
 385 390 395 400
 Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro
 405 410 415
 Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp
 420 425 430
 Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu
 435 440 445
 Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala Leu
 450 455 460
 Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys
 485 490 495
 Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala
 500 505 510
 Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu
 515 520 525
 Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln
 530 535 540
 Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly

ES 2 648 313 T3

545		550		555		560
Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg						
		565		570		575
Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys						
		580		585		590
Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly						
		595		600		605
Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys						
		610		615		620
Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe						
		625		630		635
Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr						
		645		650		655
Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met						
		660		665		670
Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly						
		675		680		685
Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly						
		690		695		700
Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile						
		705		710		715
Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr						
		725		730		735
Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr						
		740		745		750
Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly						
		755		760		765
Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln						
		770		775		780
Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Lys Asp Gly Glu Phe Ser Val Lys Cys						
		785		790		795
						800

ES 2 648 313 T3

Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn Phe
805 810 815

Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val Pro
820 825 830

Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
835 840 845

<210> 13
<211> 843
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante N62D marcada con GST, His y S con eliminación de los restos 505-525

<400> 13

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp
 420 425 430
 Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu
 435 440 445
 Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala Leu
 450 455 460
 Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp
 465 470 475 480
 Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys
 485 490 495
 Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala
 500 505 510
 Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu
 515 520 525
 Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln
 530 535 540
 Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly
 545 550 555 560
 Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg
 565 570 575
 Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys
 580 585 590
 Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly
 595 600 605
 Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys
 610 615 620
 Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe
 625 630 635 640
 Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr
 645 650 655
 Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met
 660 665 670

ES 2 648 313 T3

Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly
 675 680 685
 Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly
 690 695 700
 Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile
 705 710 715 720
 Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr
 725 730 735
 Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr
 740 745 750
 Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly
 755 760 765
 Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg Gln
 770 775 780
 Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Asp Gly Phe Ser Val Lys Cys Ala Gly
 785 790 795 800
 Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys Val
 805 810 815
 Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly Gly
 820 825 830
 Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 835 840

<210> 14
 <211> 7667
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> plásmido que codifica la polimerasa Phi29 mutante N62D

<400> 14

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgcgct cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggttc 240

ES 2 648 313 T3

acgtagtggg	ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacggt	300
ctttaatagt	ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggtctattc	360
ttttgattta	taagggatth	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	420
acaaaaatth	aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgtht	acaatttcag	gtggcactth	480
tgggggaaat	gtgcgcgga	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	540
tccgctcatg	aattaattct	tagaaaaact	catcgagcat	caaataaac	tgcaatttat	600
tcatatcagg	attatcaata	ccatattttt	gaaaaagccg	tttctgtaat	gaaggagaaa	660
actcaccgag	gcagttccat	aggatggcaa	gatcctggta	tgggtctgcg	attccgactc	720
gtccaacatc	aatacaacct	attaatttcc	cctcgtcaaa	aataaggtht	tcaagtgaga	780
aatcaccatg	agtgcagact	gaatccggtg	agaatggcaa	aagthtatgc	atttctttcc	840
agacttgtht	aacaggccag	ccattacgct	cgtcatcaaa	atcactcgca	tcaaccaaac	900
cgttattcat	tctgtattgc	gcctgagcga	gacgaaatac	gcgatcgctg	ttaaaaggac	960
aattacaaac	aggaatcgaa	tgcaaccggc	gcaggaacac	tgccagcgca	tcaacaatat	1020
tttcacctga	atcaggatat	tcttctaata	cctggaatgc	tgthttcccg	gggatcgag	1080
tgggtgagta	ccatgcata	tcaggagtac	ggataaaatg	cttgatggth	ggaagaggca	1140
taaattccgt	cagccagtht	agtctgacca	tctcatctgt	aacatcattg	gcaacgctac	1200
ctttgccatg	tttcagaaac	aactctggcg	catcgggctt	cccatacaat	cgatagattg	1260
tgcacactga	ttgcccagaa	ttatcgcgag	cccatttata	cccataaaa	tcagcatcca	1320
tgthtgaatt	taatcgcggc	ctagagcaag	acgtthcccg	ttgaatatgg	ctcataaacac	1380
cccttgattt	actgthtatg	taagcagaca	gtthttattgt	tcatagacaa	aatcccttaa	1440
cgtgagthtt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	1500
gatcctthtt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaaaca	aaaaaccacc	gctaccagcg	1560
gtggthttgt	tgcgggatca	agagctacca	actctthttc	cgaaggtaac	tggttctcagc	1620
agagcgcaga	taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	1680
aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatac	tgthaccagt	ggctgctgcc	1740
agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	1800
cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	aacgacctac	1860
accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaaggagaga	1920
aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcgggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	1980
ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	2040
cgtcgattth	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	2100
gcctthttac	ggttcctggc	ctthtgctgg	cctthtgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	2160

ES 2 648 313 T3

tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	2220
agccgaacga	ccgagcgag	cgagtcagt	agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	2280
tatcttctcc	ttacgcacat	gtgcggtatt	tcacaccgca	tatatggtgc	actctcagta	2340
caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	agtatacact	ccgctatcgc	tacgtgactg	2400
ggatcatggct	gcgccccgac	acccgccaac	acccgctgac	gcgcccctgac	gggcttgtct	2460
gctcccgga	tccgcttaca	gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	2520
gttttcaccg	tcatcaccga	aacgcgcgag	gcagctgcgg	taaagctcat	cagcgtggtc	2580
gtgaagcgat	tcacagatgt	ctgcctgttc	atccgcgtcc	agctcgttga	gtttctccag	2640
aagcgttaat	gtctggcttc	tgataaagcg	ggccatgtta	agggcggttt	tttctgttt	2700
ggatcactgat	gcctccgtgt	aagggggatt	tctgttcatt	ggggtaatga	taccgatgaa	2760
acgagagagg	atgctcacga	tacgggttac	tgatgatgaa	catgcccggt	tactggaacg	2820
ttgtgaggg	aaacaactgg	cggtatggat	gcggcgggac	cagagaaaaa	tactcaggg	2880
tcaatgccag	cgcttcgtta	atacagatgt	aggtgttcca	cagggtagcc	agcagcatcc	2940
tgcatgacag	atccggaaca	taatggtgca	gggcgctgac	ttccgcgttt	ccagacttta	3000
cgaaacacgg	aaaccgaaga	ccattcatgt	tgttgctcag	gtcgagacg	ttttgcagca	3060
gcagtcgctt	cacgttcgct	cgcgtatcgg	tgattcattc	tgctaaccag	taaggcaacc	3120
ccgccagcct	agccgggtcc	tcaacgacag	gagcacgac	atgctagtca	tgccccgcgc	3180
ccaccggaag	gagctgactg	ggttgaaggc	tctcaagggc	atcggtcgag	atcccggtgc	3240
ctaagtgtg	agctaactta	cattaattgc	gttgccgtca	ctgcccgttt	tccagtcggg	3300
aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	3360
tattggggcg	cagggtggtt	tttcttttca	ccagtgcagc	gggcaacagc	tgattgccct	3420
tcaccgcctg	gccctgagag	agttgcagca	agcgggtccac	gctggtttgc	cccagcaggc	3480
gaaaatcctg	tttgatggtg	gttaacggcg	ggatataaca	tgagctgtct	tcggtatcgt	3540
cgtatccac	taccgagatg	tccgcaccaa	cgcgcagccc	ggactcggta	atggcgcgca	3600
ttgcgcccag	cgccatctga	togttggcaa	ccagcatcgc	agtgggaacg	atgccctcat	3660
tcagcatttg	catggtttgt	tgaaaaccgg	acatggcact	ccagtcgcct	tccggttccg	3720
ctatcggtcg	aatttgattg	cgagtgcgat	atttatgcc	gccagccaga	cgcagacgcg	3780
ccgagacaga	acttaattgg	cccgctaaca	gcgcgatttg	ctggtgaccc	aatgcgacca	3840
gatgctccac	gcccagtcgc	gtaccgtctt	catgggagaa	aataatactg	ttgatgggtg	3900
tctggtcaga	gacatcaaga	aataacgccc	gaacattagt	gcaggcagct	tccacagcaa	3960
tgcatcctg	gtcatccagc	ggatagttaa	tgatcagccc	actgacgcgt	tgccgcgagaa	4020

ES 2 648 313 T3

gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc gacaccacca 4080
cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc gacggcgcgt 4140
gcagggccag actggaggtg gcaacgcaa tcagcaacga ctgtttgccc gccagttggt 4200
gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact ttttccgcg 4260
ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga taagagacac 4320
cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc ctgaattgac 4380
tctcttcggg gcgctatcat gccataccgc gaaagggttt gcgccattcg atggtgtccg 4440
ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag tagtaggttg 4500
aggccgttga gcaccgcgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc gcccaacagt 4560
cccccgcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat gagcccgaag 4620
tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc aaccgcacct 4680
gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat cgatctcgat 4740
ccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa tttccctcta 4800
gaaataatth tgthtaactt taagaaggag atatacatat gtccctata ctaggttatt 4860
ggaaaattaa gggccttggt caaccactc gacttctttt ggaatatctt gaagaaaaat 4920
atgaagagca tttgtatgag cgcgatgaag gtgataaatg gcgaaacaaa aagtttgaat 4980
tgggtttgga gtttcccaat ctctcttatt atattgatgg tgatgttaaa ttaacacagt 5040
ctatggccat catacgttat atagctgaca agcacaacat gttgggtggt tgtccaaaag 5100
agcgtgcaga gatttcaatg cttgaaggag cggttttgga tattagatac ggtgtttcga 5160
gaattgcata tagtaaaagc tttgaaactc tcaaagttga ttttcttagc aagctacctg 5220
aatgctgaa aatgttcgaa gatcgtttat gtcataaaac atattttaa ggtgatcatg 5280
taaccatcc tgacttcatg ttgtatgacg ctcttgatgt tgttttatac atggacccaa 5340
tgtgcctgga tgcgttccca aaattagttt gttttaaaaa acgtattgaa gctatcccac 5400
aaattgataa gtacttgaat tccagcaagt atatagcatg gcctttgcag ggctggcaag 5460
ccacgtttgg tgggtggcgc catcctccaa aatcggatgg ttcaactagt ggttctggtc 5520
atcaccatca ccatcactcc gcgggtctgg tgccacgcgc tagtactgca attggtatga 5580
aagaaaccgc tgctgctaaa ttcgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtaccg 5640
gtggtggctc cggtgatgac gacgacaaga gtcccatggg atacgggga tccgaattca 5700
tgaagcatat gccgagaaa atgtatagtt gtgactttga gacaactact aaagtggaag 5760
actgtagggt atgggcgtat ggttatatga atatagaaga tcacagtga tacaaaaatag 5820
gtaatagcct ggatgagttt atggcgtggg tgttgaaggt acaagctgat ctatatctcc 5880
atgatctcaa atttgacgga gcttttatca ttaactggtt ggaacgtaat ggttttaagt 5940

ES 2 648 313 T3

```

ggtcggctga cggattgcc aacacatata atacgatcat atctcgcatg ggacaatggt 6000
acatgattga tatatgttta ggctacaaag ggaacgtaa gatacataca gtgatatatg 6060
acagcttaaa gaaactaccg tttcctgtta agaagatagc taaagacttt aaactaactg 6120
ttcttaaaag tgatattgat taccacaaag aaagaccagt cggctataag ataacacccg 6180
aagaatacgc ctatattaaa aacgatattc agattattgc ggaagctctg ttaattcagt 6240
ttaagcaagg tttagaccg atgacagcag gcagtgacag tctaaaagg tcaaggata 6300
ttataaccac taagaaattc aaaaagggtg ttcctacatt gagtcttga ctcgataagg 6360
aagtgaagata cgcctataga ggtggtttta catggttaaa tgataggttc aaagaaaaag 6420
aaatcggaga aggcattggtc ttcgatgtta atagtctata tctgcacag atgtatagtc 6480
gtctccttcc atatggtgaa cctatagtat tcgagggtaa atacgtttgg gacgaagatt 6540
accactaca catacagcat atcagatgtg agttcgaatt gaaagagggc tatataccca 6600
ctatacagat aaaaagaagt aggttttata aaggtaatga gtacctaaa agtagcggcg 6660
gggagatagc cgacctctgg ttgtcaaatg tagacctaga attaataaaa gaacactacg 6720
atztatataa cgttgaatat atcagcggct taaaatttaa agcaactaca ggtttgttta 6780
aagattttat agataaatgg acgtacatca agacgacatc agaaggagcg atcaagcaac 6840
tagcaaaact gatgttaaac agtctatacg gtaaatcgc tagtaaccct gatgttacag 6900
ggaaagtccc ttatttataa gagaatgggg cgctagggtt cagacttgga gaagaggaaa 6960
caaaagaccc tgtttatata cctatgggag ttttcatcac tgcattgggt agatacacga 7020
caattacagc ggcacaggct tggtatgatc ggataatata ctgtgatact gacagcatac 7080
atttaacggg tacagagata cctgatgtta taaaagatat agttgaccct aagaaattgg 7140
gatactgggc acatgaaagt acattcaaaa gagctaaata tctgagacag aagacctata 7200
tacaagacat ctatatgaaa gaagtagatg gtaagttagt agaaggtagt ccagatgatt 7260
acactgatat aaaatttagt gttaaatgtg cggaatgac tgacaagatt aagaagagg 7320
ttacgtttga gaatttcaaa gtcggattca gtcggaaaat gaagcctaag cctgtgcaag 7380
tgccggggcg ggtggttctg gttgatgaca cattcacaat caaataagaa ttctgtacag 7440
gccttggcgc gcctgcaggc gagctccgtc gacaagcttg cggccgcact cgagcaccac 7500
caccaccacc accaccacta attgattaat acctaggctg ctaaacaag cccgaaagga 7560
agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa 7620
acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccgat 7667

```

<210> 15
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante K135A-N62D
 <400> 15

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctgccgactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataaacacc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gtttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatggttta atgataggtt caaagaaaaa      720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggtg aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa atgtacactag aattaatgaa agaactactac     1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt     1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa     1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca     1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctaggtt tcagacttgg agaagaggaa     1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg     1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata     1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgaccc taagaaattg     1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat     1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat     1560
tacctgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag     1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa     1680
gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

<210> 16
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante E375H-N62D
 <400> 16

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggt tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatgggtta atgatagggt caaagaaaaa      720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacggtga acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa atgtacac tagacac tagacac tagacac      1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt      1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cacacggagc gatcaagcaa      1140
ctagcaaaac tgatgtttaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca      1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa      1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg      1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata      1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacct taagaaattg      1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat      1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat      1560
tacctgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag      1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa      1680
gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

5 <210> 17
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante E375S-N62D
 <400> 17

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtgggttt acatgggtta atgatagggt caaagaaaaa      720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa atgtacacatg aattaatgaa agaactac      1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt      1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat caagcggagc gatcaagcaa      1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca      1200
gggaaagtcc cttatttaaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa      1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg      1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata      1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacct taagaaattg      1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat      1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat      1560
tacctgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag      1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa      1680
gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

5 <210> 18
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante L384R-N62D
 <400> 18

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtgggttt acatgggtta atgatagggt caaagaaaaa      720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggtg aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa atgtacactag aattaatgaa agaacactac     1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt     1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa     1140
ctagcaaaac ggatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca     1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa     1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg     1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata     1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacct taagaaattg     1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat     1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat     1560
tactactgata taaaatttag tgttaaattg gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag     1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa     1680
gtgccggggc ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

5 <210> 19
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante E486A-N62D
 <400> 19

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatattc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggt tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatgggtta atgatagggt caaagaaaaa      720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa atgtacacatg aattaatgaa agaacactac     1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt     1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa     1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca     1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa     1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg     1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata     1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgaccc taagaaattg     1440
ggatactggg cacatgccag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat     1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat     1560
tacctgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag     1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa     1680
gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

5 <210> 20
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante E486D-N62D
 <400> 20

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatggttta atgatagggt caaagaaaaa      720
gaaatcgagg aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaaat gtagacctag aattaatgaa agaacactac     1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt     1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa     1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca     1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcgacttgg agaagaggaa     1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg     1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata     1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgaccc taagaaattg     1440
ggatactggg cacatgacag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat     1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtaagttag tagaaggtag tccagatgat     1560
tacctgata taaaatttag tgttaaagt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag     1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa     1680
gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

5 <210> 21
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante K512A-N62D
 <400> 21

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatattc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggt tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatgggtta atgatatggt caaagaaaaa      720
gaaatcggag aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggta aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa attagacctag aattaatgaa agaactactac      1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt      1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa      1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca      1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa      1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg      1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggtataat actgtgatac tgacagcata      1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacct taagaaattg      1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat      1500
atacaagaca tctatatgaa agaagtagat ggtgccttag tagaaggtag tccagatgat      1560
tacctgata taaaatttag tgttaaatgt gcgggaatga ctgacaagat taagaaagag      1620
gttacgtttg agaatttcaa agtcggattc agtcggaaaa tgaagcctaa gcctgtgcaa      1680
gtgccgggcg ggggtggttct ggttgatgac acattcacia tcaaataa      1728

```

5 <210> 22
 <211> 1677
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante N62D con eliminación de los restos 505-525
 <400> 22

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataaacacc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatggttaa atgataggtt caaagaaaaa      720
gaaatcgagg aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggtg aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaaat gtagacctag aattaatgaa agaacactac     1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt     1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa     1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaacct tgatgttaca     1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa     1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg     1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata     1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgacct taagaaattg     1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat     1500
atacaagaca tcaaggatgg agagtttagt gttaaattgt cgggaatgac tgacaagatt     1560
aagaaagagg ttacgtttga gaatttcaaa gtcggattca gtcggaaaat gaagcctaag     1620
cctgtgcaag tgccggggcg ggtggttctg gttgatgaca cattcacaat caaataa      1677

```

5 <210> 23
 <211> 1671
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> codifica la polimerasa Phi29 mutante N62D con eliminación de los restos 505-525
 <400> 23

ES 2 648 313 T3

```

atgaagcaca tgccgagaaa gatgtatagt tgtgactttg agacaactac taaagtggaa      60
gactgtaggg tatgggcgta tggttatatg aatatagaag atcacagtga gtacaaaata      120
ggtaatagcc tggatgagtt tatggcgtgg gtgttgaagg tacaagctga tctatatttc      180
catgatctca aatttgacgg agcttttatc attaactggg tggaacgtaa tggttttaag      240
tggtcggctg acggattgcc aaacacatat aatacgatca tatctcgcat gggacaatgg      300
tacatgattg atatatgttt aggctacaaa gggaaacgta agatacatag agtgatatat      360
gacagcttaa agaaactacc gtttcctggt aagaagatag ctaaagactt taaactaact      420
gttcttaaag gtgatattga ttaccacaaa gaaagaccag tcggctataa gataacaccc      480
gaagaatacg cctatatata aaacgatatt cagattattg cggaagctct gttaattcag      540
tttaagcaag gtttagaccg gatgacagca ggcagtgaca gtctaaaagg tttcaaggat      600
attataacca ctaagaaatt caaaaagggtg tttcctacat tgagtcttgg actcgataag      660
gaagtgagat acgcctatag aggtggtttt acatggttaa atgatagggt caaagaaaaa      720
gaaatcgagg aaggcatggt cttcgatggt aatagtctat atcctgcaca gatgtatagt      780
cgtctccttc catacgggtg acctatagta ttcgagggtg aatacgtttg ggacgaagat      840
taccactac acatacagca tatcagatgt gagttcgaat tgaaagaggg ctatataccc      900
actatacaga taaaagaag taggttttat aaaggtaatg agtacctaaa aagtagcggc      960
ggggagatag ccgacctctg gttgtcaa atgtacacac aattaatgaa agaacactac     1020
gatttatata acgttgaata tatcagcggc ttaaaattta aagcaactac aggtttgttt     1080
aaagatttta tagataaatg gacgtacatc aagacgacat cagaaggagc gatcaagcaa     1140
ctagcaaaac tgatgttaaa cagtctatac ggtaaattcg ctagtaaccc tgatgttaca     1200
gggaaagtcc cttattttaa agagaatggg gcgctagggt tcagacttgg agaagaggaa     1260
acaaaagacc ctgtttatac acctatgggc gttttcatca ctgcatgggc tagatacacg     1320
acaattacag cggcacaggc ttgttatgat cggataatat actgtgatac tgacagcata     1380
catttaacgg gtacagagat acctgatgta ataaaagata tagttgaccc taagaaattg     1440
ggatactggg cacatgaaag tacattcaaa agagctaaat atctgagaca gaagacctat     1500
atacaagaca tcgacggctt tagtggttaa tgtgcgggaa tgactgacaa gattaagaaa     1560
gaggttacgt ttgagaattt caaagtcgga ttcagtcgga aatgaagcc taagcctgtg     1620
caagtgccgg gcggggtggt tctggttgat gacacattca caatcaaata a              1671

```

5 <210> 24
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante K135A-N62D
 <400> 24

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

5 <210> 25
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante E375H-N62D

ES 2 648 313 T3

<400> 25

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
<211> 575
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante E375S-N62D

<400> 26

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

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

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

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

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys
 340 345 350
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr
 355 360 365
 Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Ser Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu
 370 375 380
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe
 420 425 430
 Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys
 435 440 445
 Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly
 450 455 460
 Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg
 485 490 495
 Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys
 500 505 510
 Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val
 515 520 525
 Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu
 530 535 540
 Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln
 545 550 555 560
 Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 565 570 575

<210> 27
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante E375K-N62D

<400> 27

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Ala	Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	225	230	235	240
Glu	Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	245	250	255	
Gln	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	260	265	270	
Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	275	280	285	
Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	290	295	300	
Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	305	310	315	320
Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	325	330	335	
Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	340	345	350	
Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	355	360	365	
Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	370	375	380	
Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Val	Thr	385	390	395	400
Gly	Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	405	410	415	
Gly	Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe	420	425	430	
Ile	Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	435	440	445	
Tyr	Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly	450	455	460	
Thr	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	465	470	475	480

ES 2 648 313 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 575
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante E375R-N62D

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 648 313 T3

Arg	Lys	Ile	His	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Phe	115	120	125
Pro	Val	Lys	Lys	Ile	Ala	Lys	Asp	Phe	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	130	135	140
Asp	Ile	Asp	Tyr	His	Lys	Glu	Arg	Pro	Val	Gly	Tyr	Lys	Ile	Thr	Pro	145	150	155
Glu	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ile	Ala	Glu	Ala	165	170	175
Leu	Leu	Ile	Gln	Phe	Lys	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	180	185	190
Asp	Ser	Leu	Lys	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Thr	Thr	Lys	Lys	Phe	Lys	195	200	205
Lys	Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Arg	Tyr	210	215	220
Ala	Tyr	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Trp	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Lys	225	230	235
Glu	Ile	Gly	Glu	Gly	Met	Val	Phe	Asp	Val	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	245	250	255
Gln	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	260	265	270
Gly	Lys	Tyr	Val	Trp	Asp	Glu	Asp	Tyr	Pro	Leu	His	Ile	Gln	His	Ile	275	280	285
Arg	Cys	Glu	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	290	295	300
Lys	Arg	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	Gly	Asn	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	305	310	315
Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Met	325	330	335
Lys	Glu	His	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	340	345	350
Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Thr	355	360	365

ES 2 648 313 T3

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Arg Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu
 370 375 380
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe
 420 425 430
 Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys
 435 440 445
 Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly
 450 455 460
 Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg
 485 490 495
 Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys
 500 505 510
 Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val
 515 520 525
 Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu
 530 535 540
 Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln
 545 550 555 560
 Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 565 570 575

<210> 29
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante L384R-N62D

<400> 29

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

500

505

510

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

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

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

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

<210> 30

<211> 575

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polimerasa Phi29 mutante E486A-N62D

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

385		390		395		400									
Gly	Lys	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu
				405					410					415	
Gly	Glu	Glu	Glu	Thr	Lys	Asp	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Met	Gly	Val	Phe
			420					425					430		
Ile	Thr	Ala	Trp	Ala	Arg	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys
		435					440					445			
Tyr	Asp	Arg	Ile	Ile	Tyr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Gly
	450					455					460				
Thr	Glu	Ile	Pro	Asp	Val	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Leu
465					470					475					480
Gly	Tyr	Trp	Ala	His	Ala	Ser	Thr	Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Tyr	Leu	Arg
				485					490					495	
Gln	Lys	Thr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Lys
			500					505					510		
Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val
		515					520					525			
Lys	Cys	Ala	Gly	Met	Thr	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Phe	Glu
	530					535					540				
Asn	Phe	Lys	Val	Gly	Phe	Ser	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Lys	Pro	Val	Gln
545					550					555					560
Val	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Asp	Asp	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys	
				565					570					575	

<210> 31
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante E486D-N62D

<400> 31

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

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

275		280		285
Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile				
290		295		300
Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly				
305		310		315
Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met				
		325		330
Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys				
		340		345
Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr				
		355		360
Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu				
		370		375
Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr				
		385		390
Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu				
		405		410
Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe				
		420		425
Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys				
		435		440
Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly				
		450		455
Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu				
		465		470
Gly Tyr Trp Ala His Asp Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg				
		485		490
Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys				
		500		505
Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val				
		515		520
Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu				
		530		535
Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln				
		545		550
Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys				
		565		570

ES 2 648 313 T3

<210> 32
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante K512A-N62D

<400> 32

10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33
<211> 558
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polimerasa Phi29 mutante N62D con eliminación de los restos 505-525

<400> 33

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

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

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

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asp Leu Lys

ES 2 648 313 T3

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

ES 2 648 313 T3

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met
 325 330 335
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys
 340 345 350
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr
 355 360 365
 Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu
 370 375 380
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe
 420 425 430
 Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys
 435 440 445
 Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly
 450 455 460
 Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg
 485 490 495
 Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Lys Asp Gly Glu Phe Ser Val Lys
 500 505 510
 Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn
 515 520 525
 Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val
 530 535 540
 Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
 545 550 555

<210> 34
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polimerasa Phi29 mutante N62D con eliminación de los restos 505-525

ES 2 648 313 T3

<400> 34

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

ES 2 648 313 T3

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr
 210 215 220
 Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys
 225 230 235 240
 Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala
 245 250 255
 Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu
 260 265 270
 Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile
 275 280 285
 Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile
 290 295 300
 Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met
 325 330 335
 Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys
 340 345 350
 Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr
 355 360 365
 Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu
 370 375 380
 Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe
 420 425 430
 Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys
 435 440 445
 Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly
 450 455 460

ES 2 648 313 T3

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

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

Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Asp Gly Phe Ser Val Lys Cys Ala
500 505 510

Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys
515 520 525

Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly
530 535 540

Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
545 550 555

<210> 35
<211> 35
<212> PRT
<213> Bacteriófago phi-29

<400> 35

Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val
1 5 10 15

Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys Cys
20 25 30

Ala Gly Met
35

<210> 36
<211> 35
<212> PRT
<213> Bacteriófago B103

<400> 36

Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Ala Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile
1 5 10 15

Glu Cys Ser Pro Asp Glu Ala Thr Thr Thr Lys Phe Ser Val Lys Cys
20 25 30

Ala Gly Met
35

<210> 37
<211> 35
<212> PRT
<213> Bacteriófago PZA

<400> 37

ES 2 648 313 T3

	Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val
	1 5 10 15
	Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Thr Ile Lys Phe Ser Val Lys Cys
	20 25 30
	Ala Gly Met
	35
5	<210> 38 <211> 35 <212> PRT <213> Bacteriófago M2 <400> 38
	Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Val Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Lys
	1 5 10 15
	Glu Cys Ser Pro Asp Glu Ala Thr Thr Thr Lys Phe Ser Val Lys Cys
	20 25 30
10	Ala Gly Met
	35
15	<210> 39 <211> 36 <212> PRT <213> Bacteriófago G1 <400> 39
	Thr Tyr Phe Ile Glu Thr Thr Trp Lys Glu Asn Asp Lys Gly Lys Leu
	1 5 10 15
	Val Val Cys Glu Pro Gln Asp Ala Thr Lys Val Lys Pro Lys Ile Ala
	20 25 30
20	Cys Ala Gly Met
	35
25	<210> 40 <211> 22 <212> PRT <213> Bacteriófago CP-1 <400> 40
	Leu Tyr Ile Glu Glu Leu Ile Gln Glu Asp Gly Thr Thr His Leu Asp
	1 5 10 15
	Val Lys Gly Ala Gly Met
	20
30	<210> 41 <211> 45 <212> PRT <213> Bacteriófago phi-29
35	<400> 41

ES 2 648 313 T3

	Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	
	1				5					10					15		
	Trp	Thr	Tyr	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	
				20					25					30			
	Lys	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser				
			35					40					45				
5	<210> 42 <211> 45 <212> PRT <213> Bacteriófago B103 <400> 42																
	Phe	Lys	Phe	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Glu	Phe	Ile	Asp	Lys	
	1				5					10					15		
	Trp	Thr	Tyr	Val	Lys	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Ala	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	
				20					25					30			
10	Lys	Leu	Met	Phe	Asp	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser				
			35					40					45				
15	<210> 43 <211> 45 <212> PRT <213> Bacteriófago PZA <400> 43																
	Leu	Lys	Phe	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	
	1				5					10					15		
	Trp	Thr	His	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	
				20					25					30			
20	Lys	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser				
			35					40					45				
25	<210> 44 <211> 45 <212> PRT <213> Bacteriófago M2 <400> 44																
	Phe	Lys	Phe	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Asp	Lys	
	1				5					10					15		
	Trp	Thr	Tyr	Val	Lys	Thr	His	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	
				20					25					30			
30	Lys	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Phe	Ala	Ser				
			35					40					45				

ES 2 648 313 T3

<210> 45
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago G1
 5
 <400> 45
 Phe Met Phe Lys Gly Phe Ile Gly Phe Phe Asp Glu Tyr Ile Asp Arg
 1 5 10 15
 Phe Met Glu Ile Lys Asn Ser Pro Asp Ser Ser Ala Glu Gln Ser Leu
 20 25 30
 Gln Ala Lys Leu Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Thr
 35 40 45
 10
 <210> 46
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago CP-1
 15
 <400> 46
 Leu Glu Phe Gln Thr Glu Ser Asp Leu Phe Asp Asp Tyr Ile Thr Thr
 1 5 10 15
 Tyr Arg Tyr Lys Lys Glu Asn Ala Gln Ser Pro Ala Glu Lys Gln Lys
 20 25 30
 Ala Lys Ile Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Gly Ala
 35 40 45
 20
 <210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago phi-29
 <400> 47
 25
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys
 1 5 10
 30
 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago B103
 <400> 48
 35
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys
 1 5 10
 40
 <210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago PZA
 <400> 49
 45
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys
 1 5 10

ES 2 648 313 T3

<210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago M2
 5
 <400> 50
 Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys
 1 5 10
 10
 <210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago G1
 15
 <400> 51
 Gly Tyr Trp Asp His Glu Ala Thr Phe Gln Arg Ala Arg
 1 5 10
 20
 <210> 52
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago CP-1
 25
 <400> 52
 Gly Lys Trp Ala His Glu Gly Arg Ala Val Lys Ala Lys
 1 5 10
 30
 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago phi-29
 <400> 53
 Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val Glu Gly
 1 5 10
 35
 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago B103
 40
 <400> 54
 Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Glu Cys
 1 5 10
 45
 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago PZA
 50
 <400> 55
 Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val Glu Gly
 1 5 10
 55
 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago M2
 60

ES 2 648 313 T3

	<400> 56	
		Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Lys Glu Cys 1 5 10
5	<210> 57 <211> 11 <212> PRT <213> Bacteriófago G1	
10	<400> 57	
		Lys Glu Asn Asp Lys Gly Lys Leu Val Val Cys 1 5 10
15	<210> 58 <211> 4 <212> PRT <213> Bacteriófago CP-1	
20	<400> 58	
		Glu Asp Gly Thr 1
25	<210> 59 <211> 10 <212> PRT <213> Bacteriófago phi-29	
	<400> 59	
30		Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu 1 5 10
35	<210> 60 <211> 10 <212> PRT <213> Bacteriófago B103	
	<400> 60	
40		Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Gln Leu 1 5 10
45	<210> 61 <211> 10 <212> PRT <213> Bacteriófago PZA	
	<400> 61	
		Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu 1 5 10
50	<210> 62 <211> 10 <212> PRT <213> Bacteriófago M2	
55	<400> 62	
		Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Gln Leu 1 5 10

ES 2 648 313 T3

5	<210> 63 <211> 10 <212> PRT <213> Bacteriófago G1 <400> 63	Val Glu Gln Ile Ala Lys Gly Phe Gly Leu 1 5 10
10	<210> 64 <211> 10 <212> PRT <213> Bacteriófago CP-1 <400> 64	Ile Ala Thr Met Ala Gly Leu Phe Lys Met 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

una ADN polimerasa recombinante, comprendiendo dicha polimerasa recombinante una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEQ ID NO:1 y comprende una sustitución de aminoácido en un sitio correspondiente a K512 respecto a la SEQ ID NO:1; y

un análogo nucleotídico que está marcado en un grupo fosfato, en el que el resto de base del análogo se selecciona del grupo que consiste en adenina, timina, guanina y citidina.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa recombinante comprende una mutación seleccionada de: una mutación K512A, una mutación K512D, una mutación K512E, una mutación K512W, una mutación K512Y, una mutación K512F, una mutación K512L y una mutación K512H.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa recombinante comprende además una mutación adicional o combinación de mutaciones seleccionadas de la tabla 8.

4. La composición de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa recombinante comprende una o más mutaciones o eliminaciones respecto a la polimerasa de tipo silvestre de la SEQ ID NO:1 que reducen o eliminan la actividad exonucleasa.

5. La composición de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa recombinante es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:1.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa recombinante comprende una o más secuencias exógenas de marcas de afinidad seleccionadas de: una secuencia de marca de 6 His, una marca GST, una secuencia de marca HA, una pluralidad de secuencias de marca de 6 His, una pluralidad de marcas GST, una pluralidad de secuencias de marca HA y combinaciones de las mismas.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que el análogo nucleotídico comprende un fluoróforo o un resto colorante.

8. La composición de la reivindicación 1, en la que el análogo nucleotídico es un análogo nucleotídico tetrafosfato, pentafosfato o hexafosfato.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa recombinante presenta una K_m reducida, una V_{max} aumentada o una tasa de ramificación reducida para el análogo nucleotídico, en comparación con la polimerasa de tipo silvestre de la SEQ ID NO:1.

10. La composición de la reivindicación 1, que comprende un molde de ADN, en la que la polimerasa recombinante incorpora el análogo nucleotídico en un ácido nucleico de copia en respuesta al ADN molde.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que el molde es un molde circular.

12. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición está presente en un sistema de secuenciación de ADN y el sistema de secuenciación comprende un Zero Mode Waveguide.

13. La composición de la reivindicación 1, en la que:

(a) el análogo nucleotídico es un análogo marcado con tetrafosfato que comprende un marcador en un fosfato delta del análogo; o

(b) el análogo es A488dC4P, A568dC4P, A633dC4P, A546dG4P o A594dT4P; o

(c) el análogo está marcado en un fosfato terminal.

14. Un método de preparación de un ADN, comprendiendo el método:

proporcionar una mezcla de reacción que comprende un molde, un resto de inicio de la replicación que forma complejos con o está integrado en el molde, una ADN polimerasa recombinante capaz de replicar al menos una parte del molde usando el resto en una reacción de polimerasa dependiente de molde, y uno o más nucleótidos, en el que el uno o más nucleótidos comprenden un análogo nucleotídico que está marcado en un grupo fosfato, en el que el resto de base del análogo se selecciona del grupo que consiste en adenina, timina, guanina y citidina;

en el que la ADN polimerasa recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la SEQ ID NO:1 y comprende una sustitución de aminoácido en un sitio correspondiente a K512 respecto a la SEQ ID NO:1; y,

5 hacer reaccionar la mezcla de tal manera que la polimerasa recombinante replica al menos una parte del molde de una manera dependiente de molde.

15. El método de la reivindicación 14, en el que la ADN polimerasa recombinante comprende una mutación seleccionada de: una mutación K512A, una mutación K512D, una mutación K512E, una mutación K512W, una mutación K512Y, una mutación K512F, una mutación K512L y una mutación K512H.

10

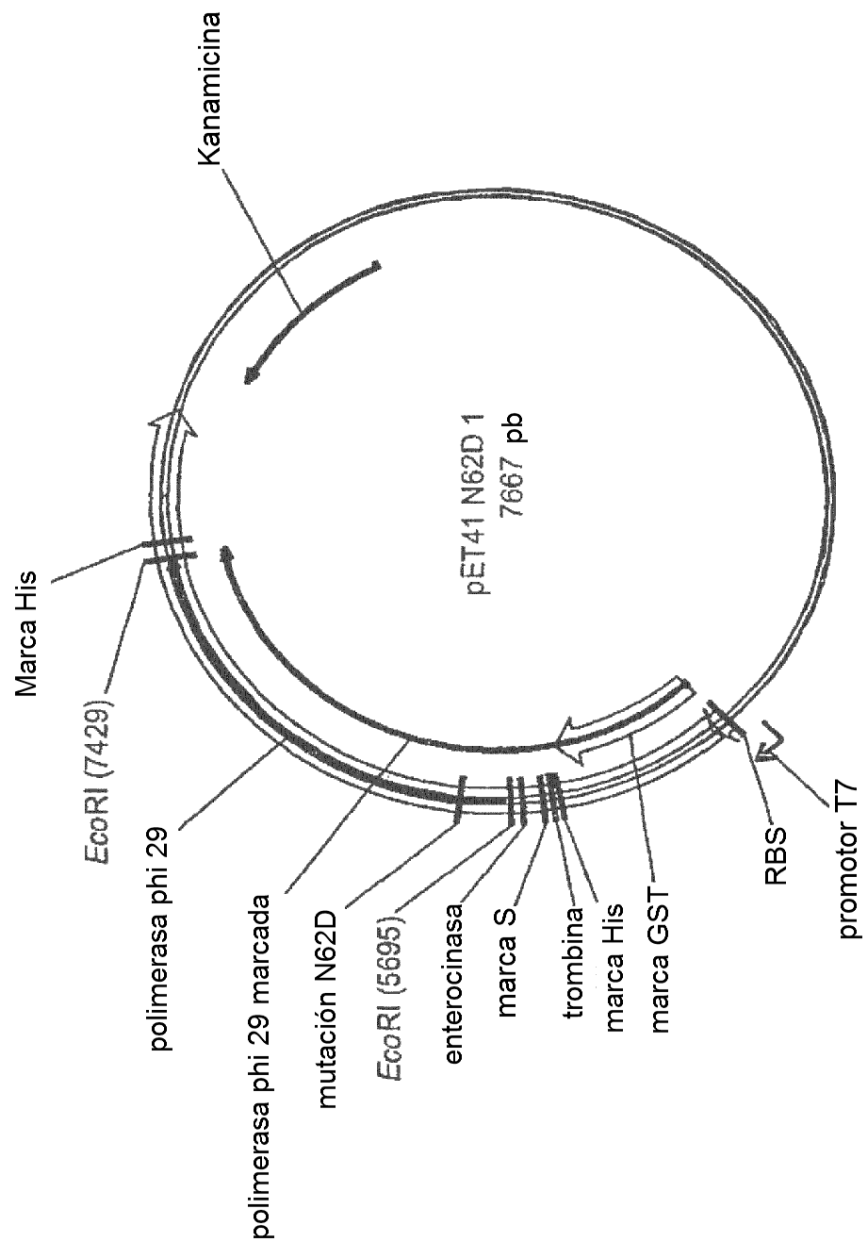


Fig. 1

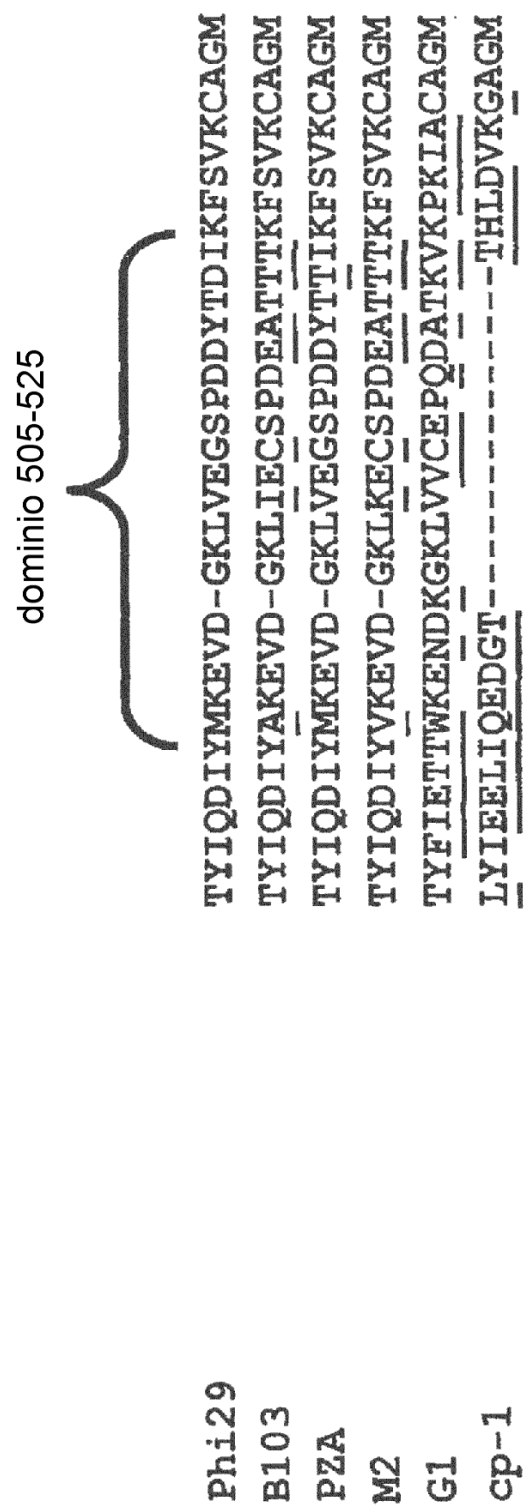


Fig. 2A

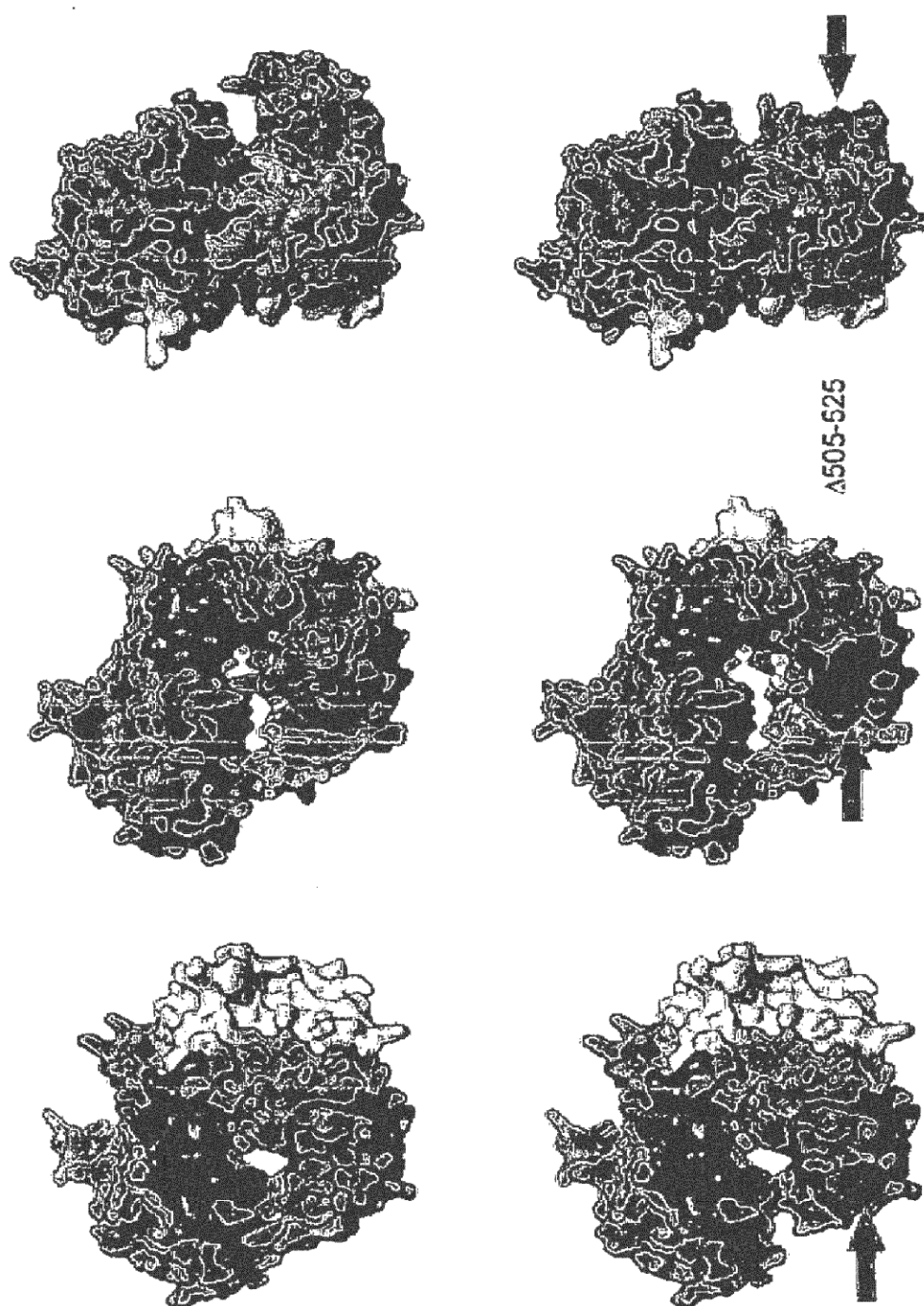


Fig. 2B

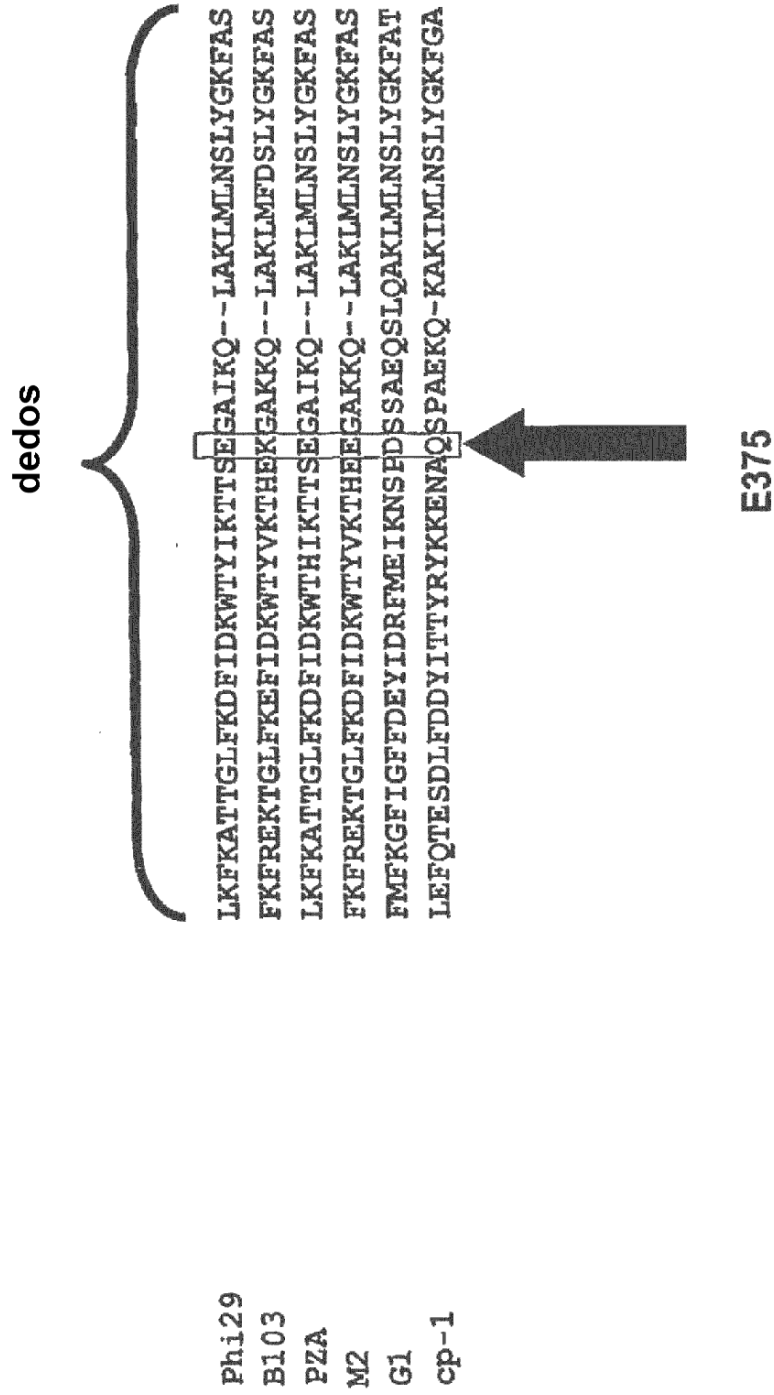


Fig. 3A

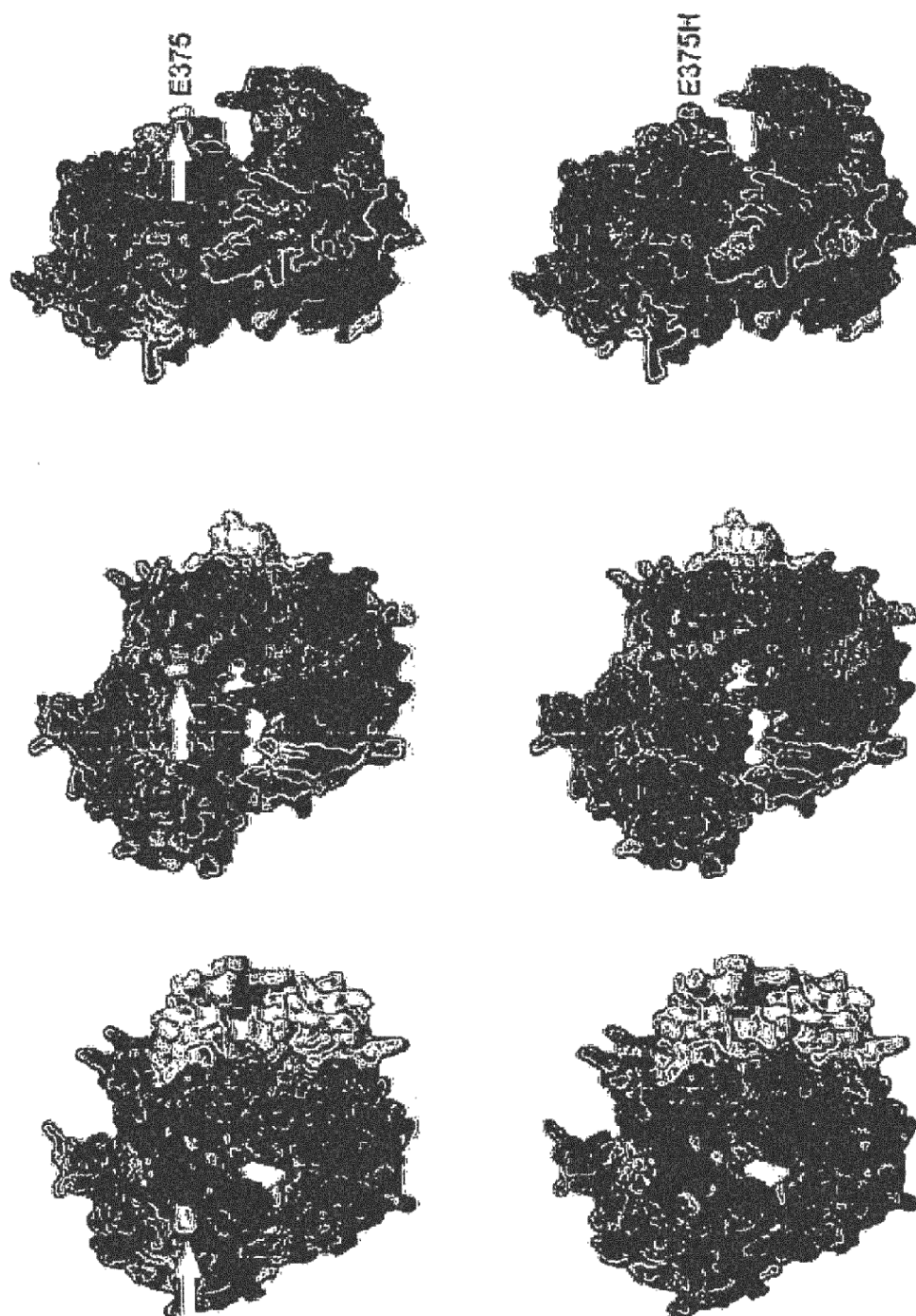


Fig. 3B



Fig. 4A

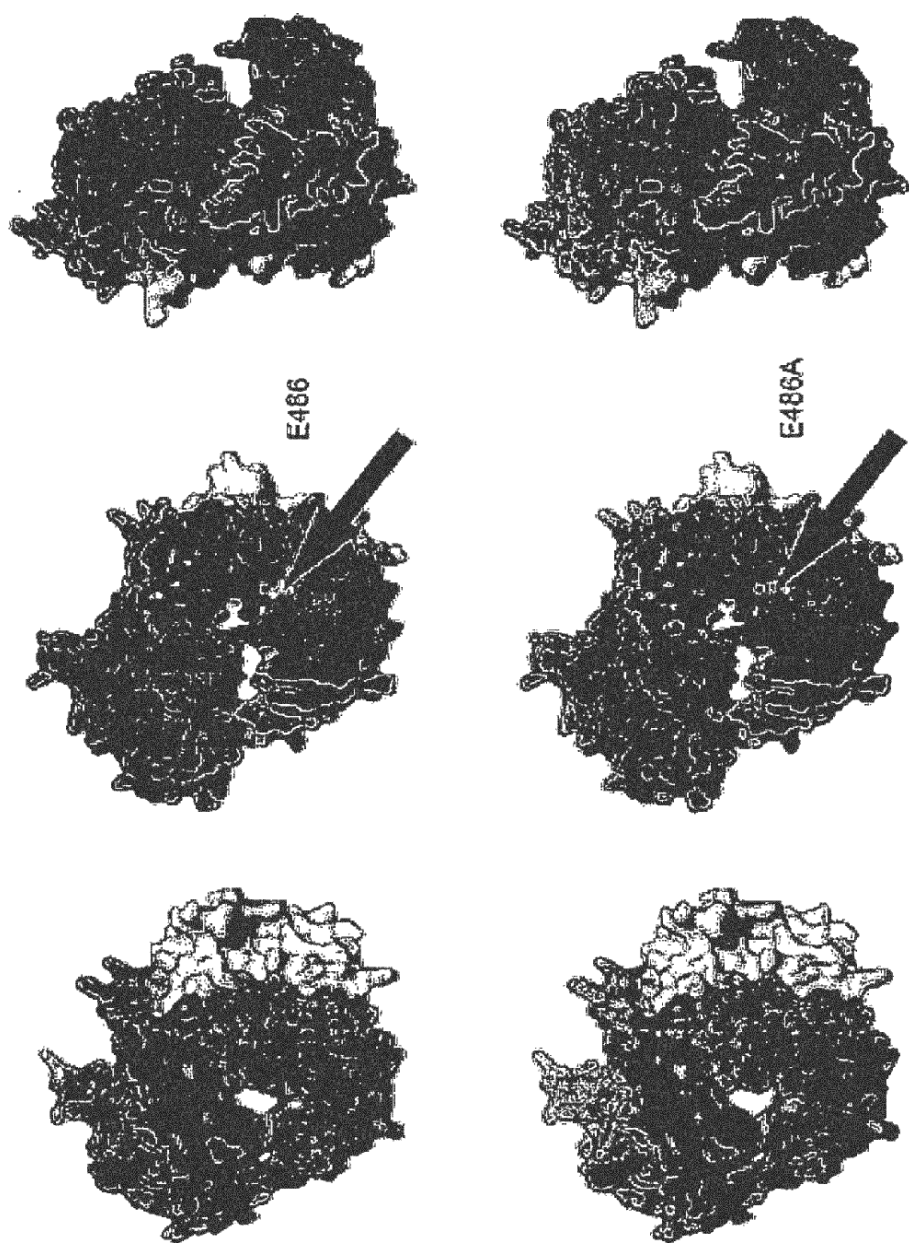


Fig. 4B



Fig. 5A

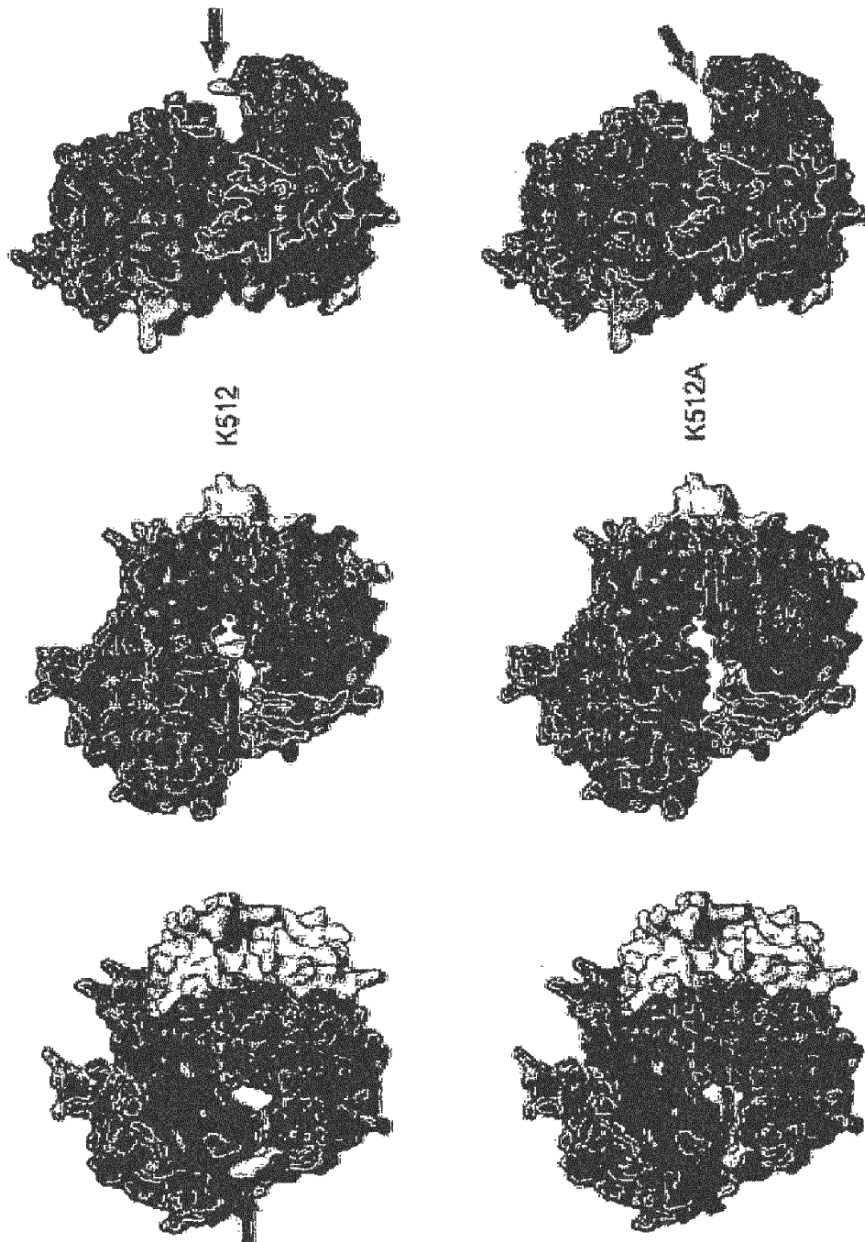


Fig. 5B

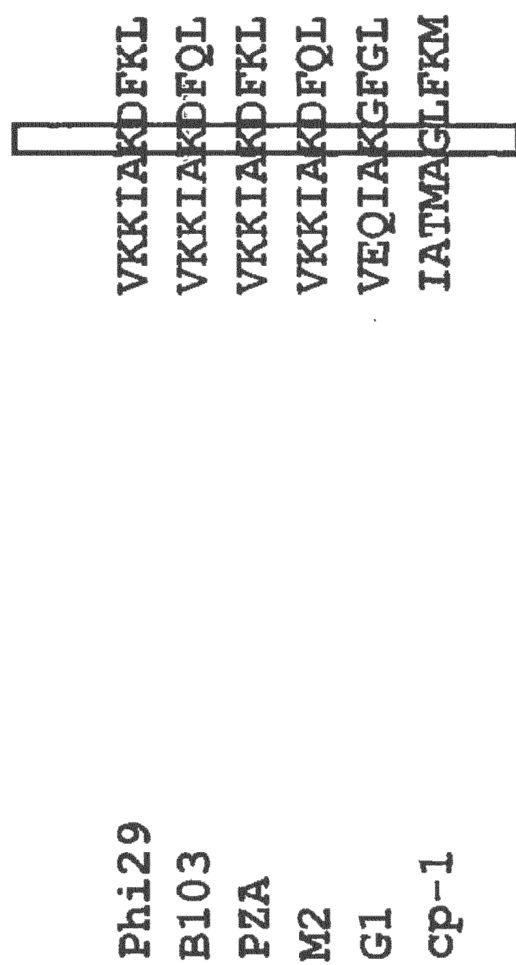


Fig. 6A

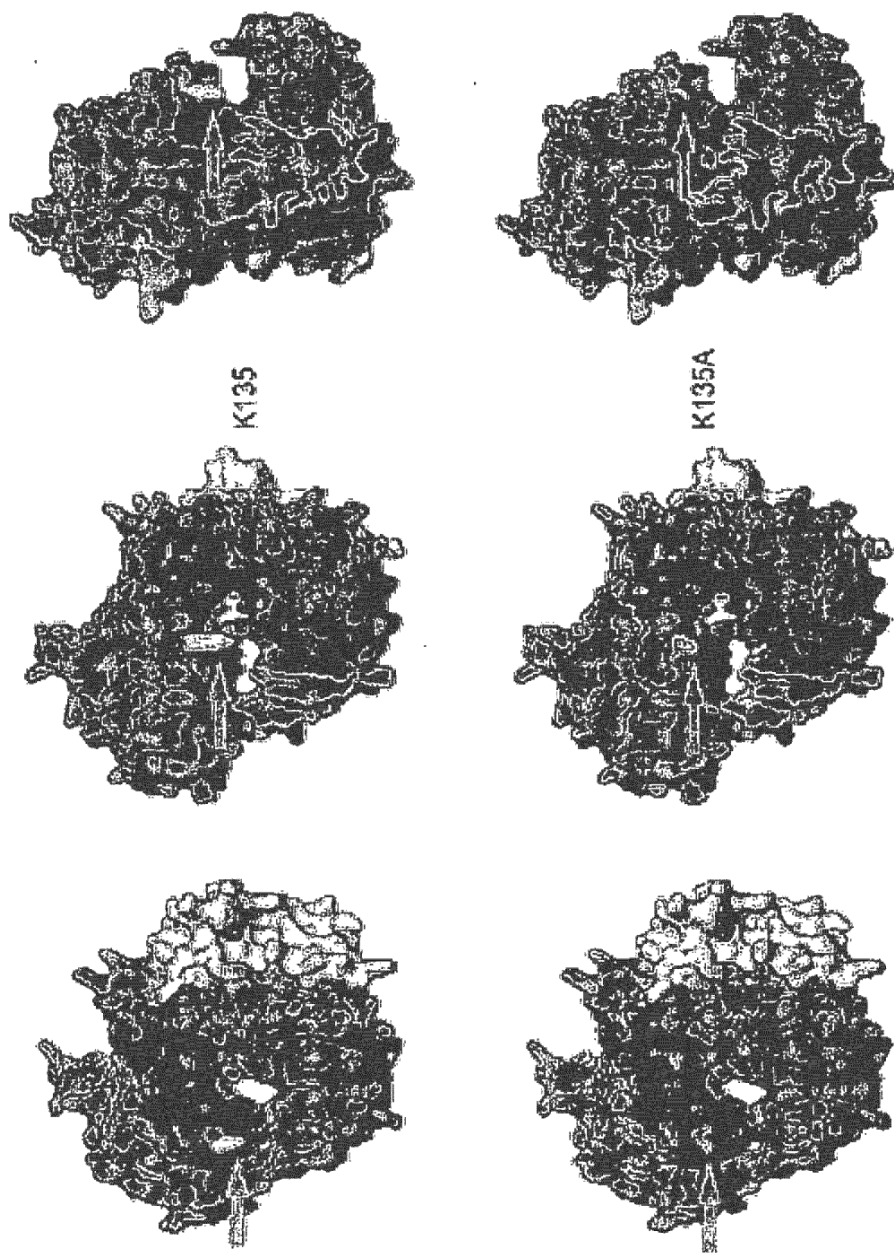


Fig. 6B

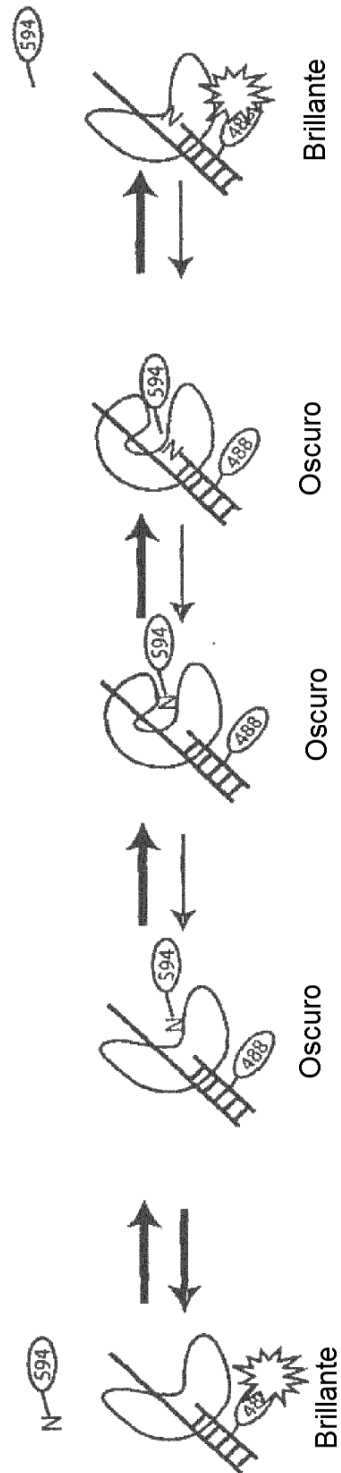


Fig. 7A

Fig 7B

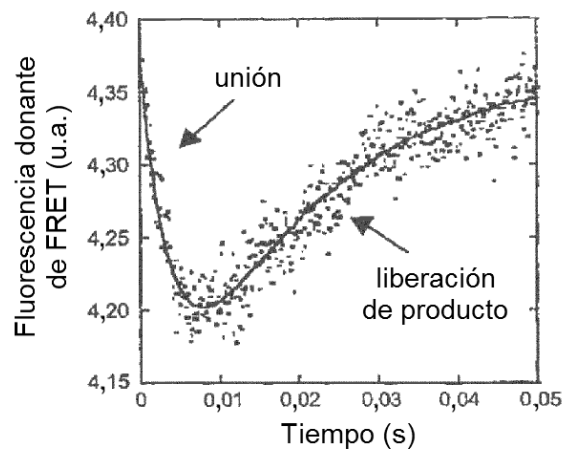


Fig 7C

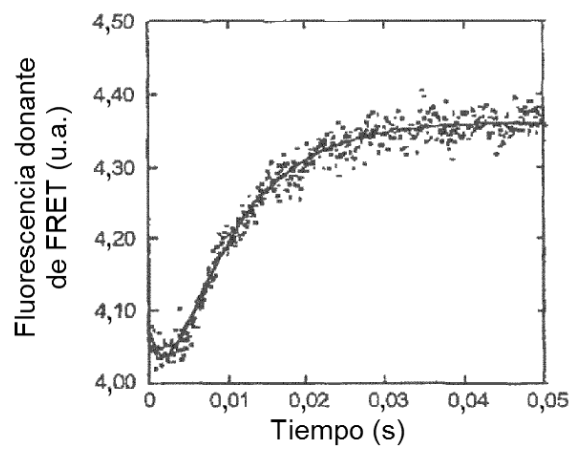
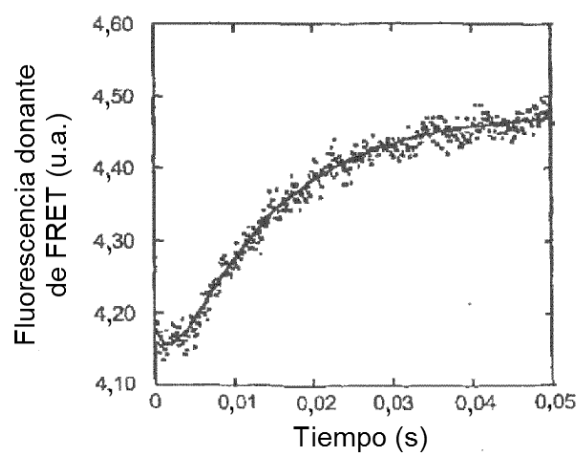


Fig 7D



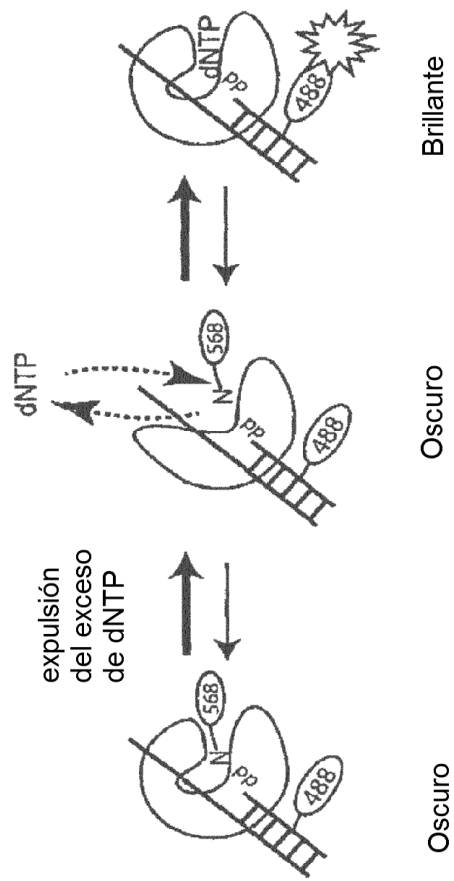


Fig. 8A

Fig 8B

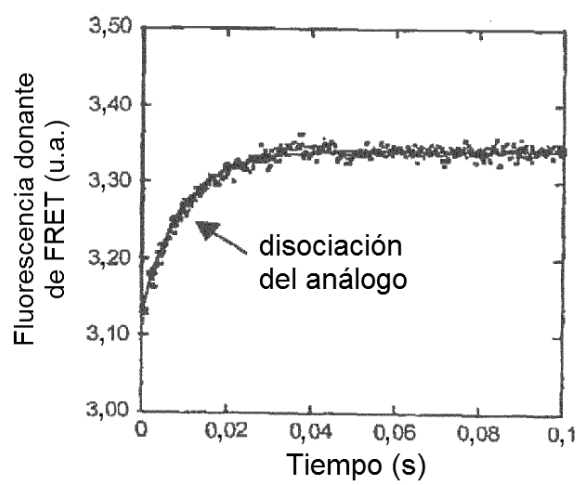


Fig 8C

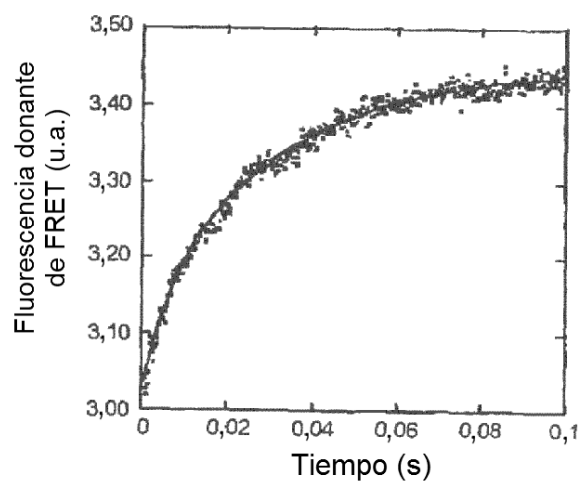
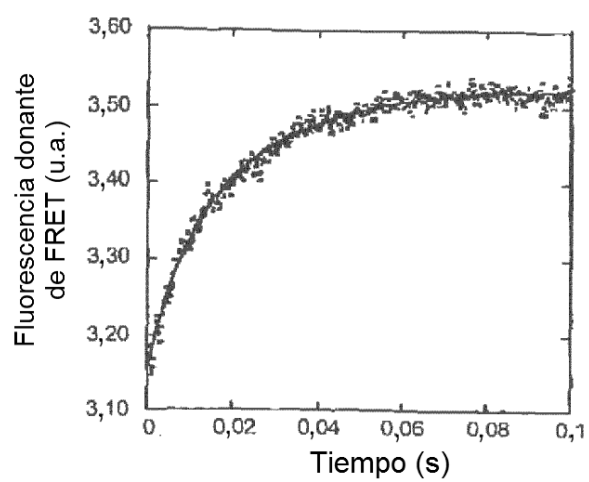


Fig 8D



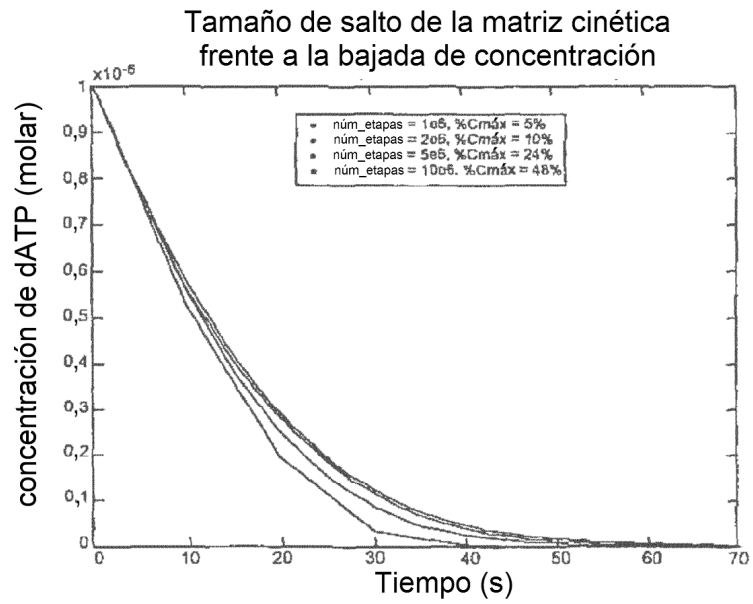


Fig 9