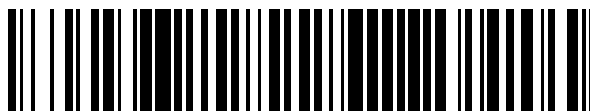


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 277**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2012 PCT/EP2012/004991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2012 E 12795341 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2788480**

54 Título: **ADN polimerasas con actividad mejorada**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568457 P

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

11.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAUER, KEITH y
SUKO, SHAWN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 716 277 T3

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

DESCRIPCIÓN

ADN polimerasas con actividad mejorada

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ADN polimerasas con actividades mejoradas, incluyendo eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia a los emparejamientos erróneos, velocidad de extensión y/o tolerancia a inhibidores de la transcriptasa inversa (RT) y las polimerasas incrementadas así como el uso de dichas polimerasas en diversas aplicaciones, incluyendo la extensión y amplificación de polinucleótidos de ácidos nucleicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las ADN polimerasas son responsables de la replicación y el mantenimiento del genoma, un papel que es fundamental para transmitir con precisión la información genética de generación a generación. Las ADN polimerasas funcionan en las células como las enzimas responsables de la síntesis del ADN. Polimerizan los desoxirribonucleósidos trifosfato en presencia de un activador de metal, tal como Mg^{2+} , en un orden dictado por el molde de ADN o molde de polinucleótidos que se copia. *In vivo*, las ADN polimerasas participan en un espectro de procesos de síntesis del ADN, incluyendo la replicación del ADN, reparación del ADN, recombinación y amplificación génica. Durante cada proceso de síntesis del ADN, el molde de ADN se copia una vez o, como máximo, unas pocas veces para producir réplicas idénticas. Por el contrario, *in vitro*, la replicación del ADN se puede repetir muchas veces, tal como, por ejemplo, durante la reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.683.202).

En los estudios iniciales con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se añadió la ADN polimerasa al inicio de cada tanda de replicación del ADN (véase la patente de EE. UU. n.º 4.683.202, *supra*). Posteriormente, se determinó que se podían obtener ADN polimerasas termoestables a partir de bacterias que crecen a temperaturas elevadas y que únicamente se necesita añadir estas enzimas una vez (véase la patente de EE. UU. n.º 4.889.818 y la patente de EE. UU. n.º 4.965.188). A las temperaturas elevadas usadas durante la PCR, estas enzimas no se inactivan irreversiblemente. Como resultado, se pueden llevar a cabo ciclos repetitivos de reacciones en cadena de la polimerasa sin añadir nuevas enzimas al inicio de cada proceso de adición de síntesis. Las ADN polimerasas, particularmente las polimerasas termoestables, son la clave de un gran número de técnicas en estudios de ADN recombinante y en el diagnóstico médico de enfermedades. Para aplicaciones diagnósticas, en particular, una secuencia de ácidos nucleicos diana únicamente puede ser una pequeña porción del ADN o ARN en cuestión, de modo que puede ser difícil detectar la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana sin amplificación.

El patrón de plegamiento global de las ADN polimerasas se asemeja a la mano derecha humana y contiene tres subdominios distintos de la palma, dedos y pulgar. (véase Beese *et al.*, *Science* 260:352-355, 1993); Patel *et al.*, *Biochemistry* 34:5351-5363, 1995). Mientras que la estructura de los subdominios de dedos y pulgar varían en gran medida entre polimerasas que difieren en tamaño y en funciones celulares, todos los subdominios catalíticos de la palma se pueden superponer. Por ejemplo, el motivo A, que interacciona con el dNTP de entrada y estabiliza el estado de transición durante la catálisis química, se puede superponer con una desviación media de aproximadamente un Å entre las ADN polimerasas de la familia α de mamíferos y β de procariontes (Wang *et al.*, *Cell* 89:1087-1099, 1997). El motivo A comienza estructuralmente en una cadena β antiparalela que contiene predominantemente residuos hidrófobos y continúa en una hélice α . La secuencia de aminoácidos primaria de los sitios activos de la ADN polimerasa está excepcionalmente conservada. Por ejemplo, en el caso del motivo A, se retiene la secuencia DYSQIELR (SEQ ID NO: 22) en polimerasas de organismos separados por muchos millones de años de evolución, incluyendo, por ejemplo, *Thermus aquaticus*, *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli*.

Además de estar bien conservado, también se ha demostrado que el sitio activo de las ADN polimerasas es relativamente mutable, puede acomodar determinadas sustituciones de aminoácidos sin reducir significativamente la actividad de la ADN polimerasa (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.602.695). Dichas ADN polimerasas mutantes pueden ofrecer diversas ventajas selectivas, por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas y de investigación que comprenden reacciones de síntesis de ácidos nucleicos.

Existen al menos dos etapas en el proceso enzimático de la polimerización del ADN; 1) la incorporación del nucleótido de entrada y 2) la extensión del nucleótido recién incorporado. En general, se considera la lealtad o "fidelidad" global de la ADN polimerasa como un conglomerado de estas dos actividades enzimáticas, pero las etapas son distintas. Una ADN polimerasa puede incorporar erróneamente el nucleótido de entrada, pero, si no se extiende eficazmente, la velocidad de extensión disminuirá mucho y la formación del producto global será mínima. De manera alternativa, es posible tener una ADN polimerasa que incorpore erróneamente el nucleótido de entrada y fácilmente extienda erróneamente el emparejamiento erróneo recién formado. En este caso, la velocidad de extensión global sería alta, pero la fidelidad global sería baja. Un ejemplo de este tipo de enzima sería la ADN polimerasa ES112 (ADN polimerasa E683R Z05, véase el documento US 7.179.590) cuando se usa Mn^{2+} como el activador de ion de metal divalente. La enzima tiene una eficacia muy alta porque, a diferencia de las ADN polimerasas típicas que tienden a vacilar/bloquearse al encontrar un emparejamiento erróneo, la ADN polimerasa

ES112 extiende fácilmente el emparejamiento erróneo. El fenotipo mostrado en ES112 es más pronunciado durante la etapa de RT, supuestamente a causa de los efectos estructurales del heterodúplex ARN/ADN frente al homodúplex ADN/ADN. Un segundo ejemplo sería si la ADN polimerasa no incorpora erróneamente con facilidad (puede ser incluso menos probable incorporar erróneamente), pero sí tiene capacidad incrementada para extender erróneamente un emparejamiento erróneo. En este caso, no se altera significativamente la fidelidad para el producto global. En general, este tipo de enzima es más favorable para las reacciones de extensión que las características de ES112 en Mn^{2+} porque se mejora la fidelidad del producto. Sin embargo, este atributo se puede utilizar para permitir la extensión errónea de un cebador oligonucleotídico emparejado erróneamente, tal como sucede cuando un cebador oligonucleotídico de una secuencia única se hibrida a una diana que tiene heterogeneidad de secuencia (por ejemplo, dianas víricas), pero la velocidad de incorporación errónea normal o más baja permite la finalización de la síntesis del ADN más allá del cebador oligonucleotídico original. Un ejemplo de este tipo de ADN polimerasa es la ADN polimerasa Z05 D580G (véase la publicación de patente de EE. UU. n.º 2009/0148891). Este tipo de actividad se denomina "tolerante al emparejamiento erróneo" a causa de que es más tolerante a los emparejamientos erróneos en el cebador oligonucleotídico. Mientras que los ejemplos anteriores han analizado las reacciones de tipo de extensión del cebador, la actividad puede ser más significativa en reacciones tales como RT-PCR y PCR donde con frecuencia se produce nuevamente la extensión del cebador. Los datos sugieren que mientras las enzimas, tales como Z05 D580G, son más "tolerantes" a los emparejamientos erróneos, también tienen capacidad potenciada para extender los cebadores oligonucleotídicos que contienen bases modificadas (por ejemplo, bases modificadas con *t*-butilbencilo) o en presencia de tintes de unión a ADN, tales como SYBR Green I (véase la publicación de patente n.º 2009/028053).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es una técnica usada en muchas aplicaciones para detectar y/o cuantificar dianas de ARN mediante amplificación. Para poder amplificar dianas de ARN mediante PCR, en primer lugar es necesario transcribir de manera inversa el molde de ARN en ADNc. Típicamente, los ensayos por RT-PCR dependen de una transcriptasa inversa no termoestable (ADN polimerasa dependiente de ARN), derivada de un organismo mesófilo, para la etapa de síntesis del ADNc inicial (RT). Se requiere una ADN polimerasa termoestable adicional para la amplificación del ADNc para tolerar las temperaturas elevadas requeridas para la desnaturalización del ácido nucleico en la PCR. Existen varios beneficios potenciales de usar ADN polimerasas termoactivas o termoestables generadas para realizar una transcripción inversa más eficaz para los ensayos por RT-PCR. La actividad de transcriptasa inversa incrementada asociada a la capacidad de usar temperaturas de incubación de transcripción inversa más altas que permiten la relajación de la estructura secundaria del molde de ARN puede dar como resultado sensibilidad del ensayo y eficacia de síntesis del ADNc global más altas. Una temperatura de incubación más alta también podría incrementar la especificidad reduciendo el falso cebado en la etapa de transcripción inversa. Las enzimas con eficacia de transcripción inversa mejorada pueden simplificar el diseño del ensayo permitiendo una concentración enzimática y/o tiempos de incubación de RT reducidos. Cuando se usan dUTP y UNG, los productos de extensión no específicos que contienen dUMP que se forman durante las condiciones establecidas no restrictivas se degradan mediante UNG y no se pueden utilizar ni como cebadores ni como moldes. Cuando se usa una transcriptasa inversa no termoestable (ADN polimerasa dependiente de ARN) derivada de un organismo mesófilo, no es posible utilizar las metodologías de dUTP y UNG. (Myers, T.W. *et al.*, Amplification of RNA: High Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with *Thermus thermophilus* DNA Polymerase, in PCR Strategies, Innis, M.A., Gelfand, D.H., and Sninsky, J.J., Eds., Academic Press, San Diego, CA, 58-68, (1995)). Sin embargo, el uso de una ADN polimerasa termoactiva o termoestable de la invención para la etapa de transcripción inversa posibilita que la reacción sea completamente compatible con la utilización del sistema de prevención de transferencia de dUTP/uracil-N-glicosilasa (UNG) (Longo *et al.*, Use of Uracil DNA Glycosylase to Control Carry-over Contamination in Polymerase Chain Reactions. *Gene* 93:125-128, (1990). Además de proporcionar un control de la contaminación por transferencia, el uso de dUTP y UNG proporciona un "inicio en caliente" para reducir la amplificación no específica (Innis y Gelfand 1999).

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción. En el presente documento se proporcionan ADN polimerasas que tienen actividades mejoradas, incluyendo eficacia de transcriptasa inversa incrementada, que puede incluir tolerancia a los emparejamientos erróneos, velocidad de extensión y/o tolerancia a inhibidores de la transcriptasa inversa (RT) y las polimerasas mejoradas, respecto a una polimerasa de control correspondiente, no modificada, y procedimientos para preparar y usar dichas ADN polimerasas. En particular, se proporciona una ADN polimerasa mejorada que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene una mayor eficacia de transcriptasa inversa en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ. ID NO: 1 es F, y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es Y. La ADN polimerasa mejorada puede tener la misma o sustancialmente similar actividad de polimerasa dependiente de ADN en comparación con una ADN polimerasa de control.

En determinados modos de realización, la ADN polimerasa mejorada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

También se divulga una ADN polimerasa que tiene una eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia a los emparejamientos erróneos, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de la RT y las polimerasas incrementadas que comprende un motivo en el dominio de la polimerasa que comprende

5 E-X₁-X₂-X₃-X₄-I-X₅-X₆-X₇-F-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄, en la que:

X₁ es A o T;

X₂ es V, Q, A, E o K;

10 X₃ es A, K, T o E;

X₄ es F, M o I;

15 X₅ es E, V, I o D;

X₆ es R, N, S o I;

X₇ es cualquier aminoácido distinto de Y;

20 X₈ es Q, V, T, R, A o E;

X₉ es S, L, Y o T;

25 X₁₀ es F o Y;

X₁₁ es P o K;

X₁₂ es K o G;

30 X₁₃ es V o I;

X₁₄ es R, F o K (SEQ ID NO: 8).

35 El aminoácido en la posición X₇ se puede seleccionar de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, I, N, Q, D, E, K, L, M o H.

También se divulga una ADN polimerasa que tiene una eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia a los emparejamientos erróneos, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de la RT y las polimerasas incrementadas que comprende un motivo en el dominio de la polimerasa que comprende

40 E-A-X₂-X₃-X₄-I-X₅-X₆-X₇-F-X₈-X₉-X₁₀-P-K-V-R, en la que:

X₂ es V, Q, A o E;

45 X₃ es A o K;

X₄ es F o M;

X₅ es E, V o I;

50 X₆ es R, N o S;

X₇ es cualquier aminoácido distinto de Y;

55 X₈ es Q, V o T;

X₉ es S o L;

X₁₀ es F o Y (SEQ ID NO: 9).

60 También se divulga una ADN polimerasa que tiene una eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia a los emparejamientos erróneos, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de la RT y las polimerasas incrementadas que comprende un motivo en el dominio de la polimerasa que comprende

65 E-A-X₂-A-F-I-E-R-X₇-F-Q-S-X₁₀-P-K-V-R, en la que:

X_2 es V , Q o A ;

X₇ es cualquier aminoácido distinto de Y:

5 X_{10} es F o Y (SEQ ID NO: 10).

También se divulga una ADN polimerasa que tiene una eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia a los emparejamientos erróneos, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de la RT y las polimerasas incrementadas que comprende un motivo en el dominio de la polimerasa que comprende

10 E-A-X₂-A-F-I-E-R-X₇-F-Q-S-X₁₀-P-K-V-R, en la que:

X_2 es V , Q o A ;

15 X_7 es F;

X₁₀ es F o Y (SEQ ID NO: 11).

20 También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D o E. También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunos modos de realización, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es G.

25 También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, S, G y A. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K.

También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de Y, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D o E, y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I. También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de Y, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K; y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, S, R, G o A. También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de Y, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es G, y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es F, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K; y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, S, R, G o A. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es F, el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es G, y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K. También se divulga que la ADN polimerasa tiene la misma o sustancialmente similar actividad de polimerasa dependiente de ADN en comparación con una ADN polimerasa de control.

También se divulga que la ADN polimerasa mejorada tiene eficacia de transcriptasa inversa incrementada, opcionalmente sin una disminución sustancial en la actividad de polimerasa dependiente de ADN, en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de Y, y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I, y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa excepto en que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es Y, y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es I. También se divulga que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es F y el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K. También se divulga que la ADN polimerasa mejorada comprende además una sustitución de aminoácido en el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1. Por tanto, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de Y, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de I y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido distinto de D o E. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es F, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es G.

En algunos modos de realización, la ADN polimerasa comprende además una mutación en uno o más aminoácidos correspondientes a una posición seleccionada de 580 y 709 de SEQ ID NO: 1. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, S, G y A. En algunos modos de realización, el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K.

Diversas ADN polimerasas son susceptibles de mutación de acuerdo con la presente invención. Son particularmente adecuadas las polimerasas termoestables, incluyendo polimerasas termoestables naturales de diversas especies de bacterias termófilas, así como polimerasas termoestables sintéticas derivadas de dichas enzimas naturales mediante delección, inserción o sustitución de aminoácidos u otra modificación. Las formas no modificadas ejemplares de polimerasa incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa CS5, CS6 o Z05, o una ADN polimerasa funcional que tenga al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la misma. En algunos modos de realización, la identidad de secuencia de aminoácidos es de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 % y más preferentemente de al menos un 95 %. Otras polimerasas no modificadas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de cualquiera de las siguientes especies de bacterias termófilas (o una ADN polimerasa funcional que tenga al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha polimerasa): *Thermotoga maritima*; *Thermus aquatilis*; *Thermus thermophilus*; *Thermus flavus*; *Thermus filiformis*; Sps17 de *Thermus* sp.; Z05 de *Thermus* sp.; *Thermotoga neopolitana*; *Thermosiphon africanus*; *Thermus caldophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus caldoteanax*. En algunos modos de realización, la identidad de secuencia de aminoácidos es de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 % y más preferentemente de al menos un 95 %. Las polimerasas adecuadas también incluyen las que tienen actividad de transcriptasa inversa (RT) y/o la capacidad de incorporar nucleótidos no convencionales, tales como ribonucleótidos u otros nucleótidos modificados en 2'.

Mientras que las ADN polimerasas termoestables que poseen actividad de transcripción inversa eficaz son particularmente adecuadas para realizar RT-PCR, especialmente RT-PCR de enzima única, las ADN polimerasas termoactivas, pero no termoestables, que poseen actividad de transcripción inversa eficaz también son susceptibles de mutación de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los atributos de eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia a los inhibidores de RT incrementadas son importantes para la etapa de RT en una RT-PCR y esta etapa no es necesario realizarla a temperaturas que inactivarían una ADN polimerasa termoactiva, pero no termoestable. Tras la etapa de RT, para realizar la etapa de amplificación por PCR se podría añadir una ADN polimerasa termoestable o podría estar ya incluida en la mezcla de reacción. Por ejemplo, se puede combinar la ADN polimerasa mejorada descrita en el presente documento con una segunda ADN polimerasa termoestable antes de la etapa de RT en un tampón adecuado para la extensión y amplificación de moldes de ADN y ARN, como se describe en los ejemplos. Ejemplos de ADN polimerasas termoestables adecuadas se describen en la patente de Estados Unidos n.º 4.889.818, y las patentes de Estados Unidos n.º 5.773.258 y 5.677.152. La segunda ADN polimerasa termoestable puede ser la ADN polimerasa AmpliTaq® (Desoxinucleósido trifosfato: ADN desoxinucleotidiltransferasa, E.C.2.7.7.7). La segunda ADN polimerasa termoestable puede ser una polimerasa termoestable inactivada reversiblemente, como se describe a continuación. La polimerasa termoestable inactivada reversiblemente puede ser la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE. UU.). Esta segunda metodología se beneficiaría especialmente del uso de una ADN polimerasa termoestable modificada químicamente (u otra tecnología HotStart para inactivar la ADN polimerasa termoestable), de modo que no sea completamente activa durante la etapa de RT. Un ejemplo de una ADN polimerasa termoactiva, pero no termoestable, que posee actividad de transcripción inversa eficaz es la ADN polimerasa de *Carboxydothermus hydrogenoformans* (Chy). (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.468.775 y 6.399.320).

La ADN polimerasa puede tener al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1. La identidad de secuencia de aminoácidos es de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 % y más preferentemente de al menos un 95 %. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 (es decir, SEQ ID NO: 1) y el aminoácido en la posición 698 puede ser cualquier aminoácido distinto de Y. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 698 puede seleccionarse de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, I, N, Q, D, E, K, L, M o H. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 698 puede ser F. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 que comprenda además una sustitución en la posición 580 y el aminoácido en la posición 580 puede ser cualquier aminoácido distinto de D o E. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 puede ser cualquier aminoácido distinto de D. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 se puede seleccionar del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 580 puede ser G. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 que comprenda además una sustitución en la posición 709 y el aminoácido en la posición 709 puede ser cualquier aminoácido distinto de I.

La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05, y el aminoácido en la posición 709 se puede seleccionar del grupo que consiste en K, R, S, G y A. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa Z05 y el aminoácido en la posición 709 puede ser K.

5 La ADN polimerasa de control puede ser una polimerasa Z05, Z05 D580G o Z05 D580G 1709K.

Las polimerasas mutantes o mejoradas pueden incluir otras modificaciones no sustitutivas. Una de dichas modificaciones es una modificación covalente reversible térmicamente que inactiva la enzima, pero que se invierte para activar la enzima tras la incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura usada típicamente para la extensión de polinucleótidos. Los reactivos ejemplares para dichas modificaciones reversibles térmicamente se describen en las patentes de EE. UU. n.º 5.773.258 y 5.677.152.

La actividad de transcriptasa inversa se puede determinar realizando amplificación por RT-PCR en tiempo real y detección de un transcrito del virus de la hepatitis C (VHC) generado a partir de las primeras 800 bases de la 5'NTR del genotipo 1b del VHC en pSP64 poli(A) (Promega). Dos o más mezclas de reacción pueden tener números valorados de copias del transcrito del virus de la hepatitis C (VHC) (por ejemplo, valoraciones 1:5, valoraciones 1:10, por ejemplo, 10 000 copias, 1000 copias, 100 copias, 10 copias, 1 copia, 0 copias en varias mezclas de reacción). La capacidad de transcriptasa inversa de una polimerasa de la invención se puede comparar con la capacidad de transcriptasa inversa de una polimerasa de referencia (por ejemplo, una polimerasa natural, no modificada o de control), durante una unidad de tiempo preseleccionada, como se describe en el presente documento. Las polimerasas con capacidad de transcriptasa inversa mejorada amplificarán el transcrito con mayor eficacia o requerirán un número más bajo de ciclos de PCR para amplificar el transcrito (es decir, presentan un valor de P_c más bajo, como se calcula en el presente documento), en comparación con una polimerasa natural o no modificada. Además, las polimerasas con función de RT mejorada también tienen replicación mejorada de moldes de ARN largos (por ejemplo, al menos 500 o 1000 o 2000 o 5000 o más nucleótidos de longitud). La eficacia de transcriptasa inversa mejorada puede incluir un tiempo de transcripción inversa más corto en comparación con una polimerasa de control. Por tanto, las polimerasas con eficacia de transcriptasa inversa incrementada transcriben de manera inversa un molde de ARN más rápidamente que una polimerasa de control o de referencia.

En diversos otros aspectos, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica una ADN polimerasa mutante o mejorada de la invención, un vector que comprende el ácido nucleico recombinante y una célula huésped transformada con el vector. En determinados modos de realización, el vector es un vector de expresión. Las células huésped que comprenden dichos vectores de expresión son útiles en los procedimientos de la invención para producir la polimerasa mutante o mejorada cultivando las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante. Las polimerasas de la invención pueden estar contenidas en kits y/o mezclas de reacción. Los aspectos de los ácidos nucleicos recombinantes, células huésped, vectores, vectores de expresión, mezclas de reacción y kits son como se describe anteriormente y en el presente documento.

En otro aspecto más se proporciona un procedimiento para llevar a cabo la extensión de polinucleótidos. El procedimiento incluye, en general, poner en contacto una ADN polimerasa que tenga eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT incrementadas de la invención con un cebador, un molde de polinucleótido y nucleósidos trifosfato en condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido. Por ejemplo, el molde de polinucleótido puede ser un molde de ARN o ADN. En determinados modos de realización, la extensión del cebador comprende una etapa de transcripción inversa de menos de aproximadamente cinco minutos. En algunos modos de realización, las condiciones adecuadas para la extensión comprenden Mg^{2+} . Los nucleótidos trifosfato pueden incluir nucleótidos no convencionales, tales como, por ejemplo, ribonucleótidos y/o nucleótidos marcados. Además, el cebador y/o el molde pueden incluir uno o más análogos de nucleótidos. En algunas variaciones, el procedimiento de extensión de polinucleótidos es un procedimiento para la amplificación de polinucleótidos que incluye poner en contacto la ADN polimerasa mutante o mejorada con un par de cebadores, el molde de polinucleótido y los nucleósidos trifosfato en condiciones adecuadas para la amplificación del polinucleótido. La reacción de extensión de polinucleótidos puede ser, por ejemplo, PCR, extensión isotérmica o secuenciación (por ejemplo, la reacción de secuenciación 454). En determinados modos de realización, el procedimiento de extensión del cebador comprende una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El molde de polinucleótido puede ser de cualquier tipo de muestra biológica.

Opcionalmente, la reacción de extensión del cebador comprende un inhibidor real o potencial de una polimerasa de referencia o no modificada. El inhibidor puede inhibir la velocidad de extensión de ácido nucleico y/o la eficacia de transcripción inversa de una polimerasa de referencia o no modificada (de control). El inhibidor puede ser hemoglobina, o un producto de degradación de la misma. Por ejemplo, el producto de degradación de hemoglobina puede ser un producto de descomposición de hemo, tal como hemina, hematoporfirina o bilirrubina. El inhibidor puede ser un quelante de hierro o un pigmento púrpura. El inhibidor puede ser heparina o melanina. El inhibidor puede ser un tinte intercalante. El tinte intercalante puede ser [2-[N-bis-(3-dimetilaminopropil)-amino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinio]⁺. El tinte intercalante puede ser [2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinio]⁺. El tinte

intercalante puede no ser [2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden]-1-fenil-quinolinio]⁺. Las condiciones adecuadas para la extensión pueden comprender Mg⁺⁺. Las condiciones adecuadas para la extensión pueden comprender Mn⁺⁺.

La presente invención también proporciona un kit útil en dicho procedimiento de extensión de polinucleótidos. El kit incluye al menos un recipiente que proporciona la ADN polimerasa mejorada de acuerdo con la invención. En determinados modos de realización, el kit incluye además uno o más recipientes adicionales que proporcionan uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, en variaciones específicas, el uno o más recipientes adicionales proporcionan nucleósidos trifosfato; un tampón adecuado para la extensión de polinucleótidos; y/o uno o más polinucleótidos de sonda o cebador, hibridables, en condiciones de extensión de polinucleótidos, a un molde de polinucleótido predeterminado. El molde de polinucleótido puede ser de cualquier tipo de muestra biológica.

Se proporcionan además mezclas de reacción que comprenden las polimerasas de la invención. Las mezclas de reacción también pueden contener un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos de sonda o cebador, nucleósidos trifosfato (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleósidos trifosfato, ribonucleósidos trifosfato, nucleósidos trifosfato marcados, nucleósidos trifosfato no convencionales), tampones, sales, marcadores (por ejemplo, fluoróforos). Las mezclas de reacción pueden comprender un quelante de hierro o un tinte púrpura. Las mezclas de reacción pueden comprender hemoglobina o un producto de degradación de hemoglobina. Por ejemplo, los productos de degradación de hemoglobina pueden incluir productos de descomposición de hemo, tales como hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. Las mezclas de reacción pueden comprender heparina o una sal de la misma. Opcionalmente, la mezcla de reacción puede comprender un tinte intercalante (incluyendo pero no limitado a los descritos anteriormente o en otra parte en el presente documento). La mezcla de reacción puede contener un ácido nucleico molde que está aislado de la sangre. El ácido nucleico molde puede ser ARN y la mezcla de reacción puede comprender heparina o una sal de la misma. La mezcla de reacción puede comprender además Mg²⁺.

La mezcla de reacción puede comprender además una segunda ADN polimerasa termoestable. La mezcla de reacción puede comprender dos o más polimerasas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede comprender una ADN polimerasa mejorada que tenga eficacia de transcripción inversa incrementada (por ejemplo, actividad incrementada que extiende un molde de ARN) como se describe en el presente documento, y otra polimerasa que tenga actividad de polimerasa dependiente de ADN. La mezcla de reacción puede comprender una combinación de una ADN polimerasa mejorada que tenga eficacia de transcripción inversa incrementada como se describe en el presente documento y una segunda polimerasa dependiente de ADN termoestable. La segunda polimerasa dependiente de ADN termoestable puede ser una polimerasa modificada reversiblemente como se describe anteriormente, de manera que la enzima sea inactiva a temperaturas adecuadas para la etapa de transcripción inversa, pero sea activa en condiciones adecuadas, por ejemplo, a temperaturas elevadas de aproximadamente 90 °C a 100 °C durante un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 12 minutos. Las condiciones adecuadas para la activación de una polimerasa termoestable inactivada reversiblemente se proporcionan, por ejemplo, en una reacción de PCR de inicio en caliente, como se describe en los ejemplos. Los ejemplos de segundas polimerasas dependientes de ADN termoestable adecuadas se describen en las patentes de EE. UU. n.º 5.773,258 y 5.677.152, *supra*.

DEFINICIONES

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede usar esencialmente cualquier procedimiento y material similar a los descritos en el presente documento, en la práctica o pruebas de la presente invención, únicamente se describen procedimientos y materiales ejemplares. Para los propósitos de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Los términos “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes al plural a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

Un “aminoácido” se refiere a cualquier unidad monomérica que se puede incorporar en un péptido, polipéptido o proteína. Como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” incluye los siguientes veinte aminoácidos alfa naturales o genéticamente codificados: alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), glutamina (Gln o Q), ácido glutámico (Glu o E), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V). En los casos en que los residuos “X” no están definidos, estos se deben definir como “cualquier aminoácido”. Las estructuras de estos veinte aminoácidos naturales se muestran, por ejemplo, en Stryer *et al.*, *Biochemistry*, 5.^a ed., Freeman and Company (2002). También pueden codificarse genéticamente aminoácidos adicionales, tales como selenocisteína y pirrolisina (Stadtman (1996) “Selenocysteine”, *Annu Rev Biochem*, 65:83-100 e Ibba *et al.* (2002) “Genetic code: introducing pyrrolysine”, *Curr Biol*, 12(13):R464-R466). El término “aminoácido” también incluye aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados (por ejemplo, que tienen cadenas laterales y/o esqueletos modificados) y análogos de aminoácidos (véase, por ejemplo, Zhang *et al.* (2004) “Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan

into proteins in mammalian cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(24):8882-8887, Anderson *et al.* (2004) "An expanded genetic code with a functional quadruplet codon" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(20):7566-7571, Ikeda *et al.* (2003) "Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo", *Protein Eng. Des. Sel.* 16(9):699-706, Chin *et al.* (2003) "An Expanded Eukaryotic Genetic Code", *Science* 301(5635):964-967, James *et al.* (2001) "Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues", *Protein Eng. Des. Sel.* 14(12):983-991, Kohrer *et al.* (2001) "Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(25):14310-14315, Bacher *et al.* (2001) "Selection and Characterization of *Escherichia coli* Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue", *J. Bacteriol.* 183(18):5414-5425, Hamano-Takaku *et al.* (2000) "A Mutant *Escherichia coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine", *J. Biol. Chem.* 275(51):40324-40328, y Budisa *et al.* (2001) "Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids", *Protein Sci.* 10(7):1281-1292.

Como ilustración adicional, un aminoácido es típicamente un ácido orgánico que incluye un grupo amino sustituido o no sustituido, un grupo carboxi sustituido o no sustituido y una o más cadenas laterales o grupos, o análogos de cualquiera de estos grupos. Las cadenas laterales ejemplares incluyen, por ejemplo, tiol, seleno, sulfonilo, alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidracina, ciano, halo, hidracida, alqueno, alquino, éter, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterociclo, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina o cualquier combinación de estos grupos. Otros aminoácidos representativos incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos que comprenden reticuladores fotoactivables, aminoácidos de unión a metal, aminoácidos con marcado de espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que contienen metal, aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interaccionan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoenmascarados y/o fotoisomerizables, aminoácidos radiactivos, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, otros aminoácidos modificados con hidrato de carbono, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos que contienen azúcar de enlace a carbono, aminoácidos activos en oxidorreducción, aminotioácidos que contienen aminoácidos y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidos de un organismo y que se pueden usar en un ensayo de supervisión o diagnóstico. El término abarca orina, sedimento de orina, sangre, saliva y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como una muestra de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos y la descendencia de los mismos. El término abarca muestras que se hayan manipulado de cualquier manera después de su adquisición, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, sedimentación o enriquecimiento para determinados componentes. El término abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejidos.

El término "mutante", en el contexto de las ADN polimerasas de la presente invención, significa un polipéptido, típicamente recombinante, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en relación con una ADN polimerasa funcional correspondiente.

El término "forma no modificada", en el contexto de una polimerasa mutante, es un término usado en el presente documento para los propósitos de definir una ADN polimerasa mutante de la presente invención: el término "forma no modificada" se refiere a una ADN polimerasa funcional que tiene la secuencia de aminoácidos de la polimerasa mutante, excepto en una o más posiciones de aminoácidos especificadas como que caracterizan la polimerasa mutante. Por tanto, la referencia a una ADN polimerasa mutante en términos de (a) su forma no modificada y (b) una o más sustituciones de aminoácidos especificadas significa que, con excepción de la(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos especificada(s), la polimerasa mutante de otro modo tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la forma no modificada en el motivo especificado. La "polimerasa no modificada" (y, por lo tanto, también la forma modificada que tiene eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT incrementadas) puede contener mutaciones adicionales para proporcionar la funcionalidad deseada, por ejemplo, incorporación mejorada de didesoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, análogos de ribonucleótidos, nucleótidos marcados con tinte, actividad de 5'-nucleasa moduladora, actividad de 3'-nucleasa moduladora (o corrección de errores) o similares. Por consiguiente, al llevar a cabo la presente invención como se describe en el presente documento, se predetermina la forma no modificada de una ADN polimerasa. La forma no modificada de una ADN polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa natural o una ADN polimerasa que ya se ha modificado intencionalmente. Una forma no modificada de la polimerasa es preferentemente una ADN polimerasa termoestable, tal como ADN polimerasas de diversas bacterias termófilas, así como variantes funcionales de las mismas que tienen identidad de secuencia sustancial con respecto a una polimerasa termoestable natural. Dichas variantes pueden incluir, por ejemplo, ADN polimerasas quiméricas, tales como, por ejemplo, las ADN polimerasas quiméricas descritas en las patentes de EE. UU. n.º 6.228.628 y 7.148.049. En determinados modos de realización, la forma no modificada de una polimerasa tiene actividad de transcriptasa inversa (RT).

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y

retiene suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de polinucleótidos posteriores y no se desnaturaliza irreversiblemente (inactiva) cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y se ejemplifican, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195 y 4.965.188. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La desnaturalización irreversible para los propósitos del presente documento se refiere a la pérdida permanente y completa de actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de manera apropiada para formar productos de extensión de polinucleótidos que sean complementarios a una hebra de ácido nucleico molde. Las ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquatilis*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, sps17 de *Thermus* sp., Z05 de *Thermus* sp., *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldodenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosiphon africanus*.

El término "termoactiva" se refiere a una enzima que mantiene las propiedades catalíticas a temperaturas usadas comúnmente para la transcripción inversa o etapas de hibridación/extensión en reacciones de RT-PCR y/o PCR (es decir, 45 °C-80 °C). Las enzimas termoestables son las que no se inactivan o desnaturalizan irreversiblemente cuando se someten a las elevadas temperaturas necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos. Las enzimas termoactivas pueden ser o no termoestables. Las ADN polimerasas termoactivas pueden ser dependientes de ADN o ARN de especies termófilas o de especies mesófilas incluyendo, pero no limitadas a, *Escherichia coli*, los virus de la leucemia murina de Moloney y los virus de la mieloblastosis aviar.

Como se usa en el presente documento, una proteína "quimérica" se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos representa un producto de fusión de subsecuencias de las secuencias de aminoácidos de al menos dos proteínas distintas. Una proteína quimérica no se produce típicamente mediante manipulación directa de secuencias de aminoácidos, sino que, más bien, se expresa a partir de un gen "quimérico" que codifica la secuencia de aminoácidos quimérica. Por ejemplo, una forma no modificada de una ADN polimerasa mutante como se divulga en el presente documento es una proteína quimérica que consiste en una región aminoterminal (N-terminal) derivada de una ADN polimerasa de una especie *Thermus* y una región carboxiterminal (C-terminal) derivada de ADN polimerasa de Tma. La región N-terminal se refiere a una región que se extiende desde el extremo N (posición de aminoácido 1) hacia un aminoácido interno. De manera similar, la región C-terminal se refiere a una región que se extiende desde un aminoácido interno hacia el extremo C.

El término "aptámero" se refiere a un ADN monocatenario que reconoce y se une a ADN polimerasa e inhibe eficazmente la actividad de polimerasa como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.693.502. El uso de aptámero y dUTP/UNG en la RT-PCR también se analiza, por ejemplo, en Smith, E.S. *et al.*, (Amplification of RNA: High-temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-activated Thermostable DNA Polymerase, en PCR Primer: A Laboratory Manual, 2.^a edición, Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 211-219, (2003)).

En el contexto de las ADN polimerasas mutantes, la "correspondencia" con otra secuencia (por ejemplo, regiones, fragmentos, posiciones de aminoácidos o nucleótidos, o similares) se basa en la convención de numeración de acuerdo con el número de posición de aminoácidos o nucleótidos y, a continuación, en la alineación de las secuencias de una manera que maximice el porcentaje de identidad de secuencia. Un aminoácido "correspondiente a la posición [X] de [secuencia específica]" se refiere a un aminoácido en un polipéptido de interés que se alinea con el aminoácido equivalente de una secuencia especificada. En general, como se describe en el presente documento, el aminoácido correspondiente a una posición de una polimerasa se puede determinar usando un algoritmo de alineación, tal como BLAST, como se describe a continuación. Puesto que no todas las posiciones dentro de una "región correspondiente" dada necesitan ser idénticas, las posiciones de no emparejamiento dentro de una región correspondiente se pueden considerar "posiciones correspondientes". Por consiguiente, como se usa en el presente documento, la referencia a una "posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido [X]" de una ADN polimerasa especificada se refiere a posiciones equivalentes, basadas en la alineación, en otras ADN polimerasas y familias y homólogos estructurales. En algunos modos de realización de la presente invención, la "correspondencia" de las posiciones de aminoácidos se determina con respecto a una región de la polimerasa que comprende uno o más motivos de SEQ ID NO: 1. Cuando una secuencia de polipéptidos de polimerasa difiere de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, por cambios en aminoácidos o adición o delección de aminoácidos), puede ser que una mutación particular asociada con una actividad mejorada como se analiza en el presente documento no esté en el mismo número de posición que está en la SEQ ID NO: 1. Esto se ilustra, por ejemplo, en la tabla 1. "Recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se ha modificado intencionalmente mediante procedimientos recombinantes. El término "ácido nucleico recombinante" en el presente documento significa un ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general, mediante la manipulación de un ácido nucleico por endonucleasas de restricción, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por tanto, un ácido nucleico de ADN polimerasa mutante aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que no están unidas normalmente se consideran ambos recombinantes para los propósitos de la presente invención. Se entiende que, una vez que se

prepara un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula huésped, se replica de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque se replican de manera no recombinante posteriormente, todavía se consideran recombinantes para los propósitos de la invención.

Una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

Un ácido nucleico está "enlazado de manera funcional" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador está enlazado de manera funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de manera funcional a una secuencia codificante si está posicionado para facilitar la traducción.

El término "célula huésped" se refiere tanto a los organismos eucariotas (por ejemplo, bacterias, levaduras y actinomicetos) como procariontes unicelulares y células sueltas de animales o plantas de orden superior cuando se cultivan en cultivo celular.

El término "vector" se refiere a una porción de ADN, típicamente bicatenario, que puede tener insertada en la misma una porción de ADN exógeno. El vector puede ser, por ejemplo, de origen plasmídico. Los vectores contienen secuencias de polinucleótidos de "replicón" que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula huésped. El ADN exógeno se define como ADN heterógeno, que es ADN no encontrado naturalmente en la célula huésped, que, por ejemplo, replica la molécula del vector, codifica un marcador seleccionable o cribable, o codifica un transgén. El vector se usa para transportar el ADN exógeno o heterógeno en una célula huésped adecuada. Una vez en la célula huésped, el vector se puede replicar independientemente o coincidiendo con el ADN cromosómico del huésped y se pueden generar varias copias del vector y su ADN insertado. Además, el vector también puede contener los elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado en una molécula de ARNm o de otro modo provocar la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión contienen adicionalmente elementos de secuencia adyacentes al ADN insertado que incrementan la semivida del ARNm expresado y/o permiten la traducción del ARNm en una molécula de proteína. Por tanto, se pueden sintetizar rápidamente muchas moléculas de ARNm y polipéptido codificadas por el ADN insertado.

El término "nucleótido", además de hacer referencia a los monómeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido naturales, se entenderá que en el presente documento se refiere a variantes estructurales relacionadas del mismo, incluyendo derivados y análogos, que sean funcionalmente equivalentes con respecto al contexto particular en el que se usa el nucleótido (por ejemplo, hibridación a una base complementaria), a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que se puede corresponder a un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo del mismo. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo, modificadas química o bioquímicamente) de los mismos y polímeros mixtos (por ejemplo, que incluyen subunidades tanto de ADN como de ARN). Las modificaciones ejemplares incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), restos pendientes (por ejemplo, polipéptidos) intercalantes (por ejemplo, acridina, soraleño y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada por medio de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros de nucleótido se enlazan por medio de enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describe en Nielsen *et al.* (*Science* 254:1497-1500, 1991). Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser o puede incluir un segmento cromosómico o de cromosoma, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ARN o ADN no marcado, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario, bicatenario o tricatenario y no está limitado a ninguna longitud particular. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos). Un oligonucleótido incluye típicamente de aproximadamente seis hasta aproximadamente 175 unidades monoméricas de ácido nucleico, más típicamente de aproximadamente ocho hasta aproximadamente 100 unidades monoméricas de ácido nucleico, y todavía más típicamente de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o más unidades monoméricas de ácido nucleico). El tamaño exacto de un oligonucleótido dependerá de muchos factores, incluyendo el uso o función final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se preparan opcionalmente mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, pero no limitado a, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión con enzimas de restricción

de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un procedimiento tal como el procedimiento de fosfotriéster de Narang *et al.* (*Meth. Enzymol.* 68: 90-99, 1979); el procedimiento de fosfodiéster de Brown *et al.* (*Meth. Enzymol.* 68: 109-151, 1979); el procedimiento de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.* (*Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862, 1981); el procedimiento de triéster de Matteucci *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185-3191, 1981); procedimientos de síntesis automatizados; o el procedimiento de soporte sólido de la patente de EE. UU. n.º 4.458.066 u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

El término "cebador" como se usa en el presente documento se refiere a un polinucleótido que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos dirigida por molde cuando se dispone en condiciones en las que se inicia la extensión de polinucleótidos (por ejemplo, en condiciones que comprenden la presencia de nucleósidos trifosfato requeridos (como se dicta por el molde que se copia) y una polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada o ciclo(s) de temperatura (por ejemplo, como en una reacción en cadena de la polimerasa)). Para ilustrar adicionalmente, también se pueden usar los cebadores en una variedad de otros procedimientos de síntesis mediados por oligonucleótidos, incluyendo como iniciadores de la síntesis de ARN *de novo* y procedimientos relacionados con la transcripción *in vitro* (por ejemplo, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) amplificación mediada por transcripción (TMA), etc.). Un cebador es típicamente un oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, oligodesoxirribonucleótido). La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero típicamente varía desde 6 a 40 nucleótidos, más típicamente desde 15 a 35 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas requieren, en general, temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero esta debe ser suficientemente complementaria para hibridarse con un molde y que se produzca la elongación del cebador. El término "par de cebadores" puede significar un conjunto de cebadores que incluye un cebador en sentido 5' (a veces llamado "directo") que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a amplificar y un cebador en antisentido 3' (a veces llamado "inverso") que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia que se va a amplificar (por ejemplo, si la secuencia diana se expresa como ARN o es un ARN). Un cebador se puede marcar, si se desea, incorporando un marcador detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, tintes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (usadas comúnmente en ensayos ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

El término "convencional" o "natural" cuando se hace referencia a bases de ácidos nucleicos, nucleósidos trifosfato o nucleótidos se refiere a los que se producen naturalmente en el polinucleótido que se describe (es decir, para el ADN estos son dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Adicionalmente, con frecuencia se utilizan dITP y 7-deaza-dGTP en lugar de dGTP y se puede utilizar 7-deaza-dATP en lugar de dATP en reacciones de síntesis de ADN *in vitro*, tales como secuenciación. Colectivamente, estos se pueden denominar dNTP.

El término "no convencional" o "modificado" cuando se refiere a una base de ácidos nucleicos, nucleósido o nucleótido incluye modificación, derivaciones o análogos de bases, nucleósidos o nucleótidos convencionales que se producen naturalmente en un polinucleótido particular. Determinados nucleótidos no convencionales están modificados en la posición 2' del azúcar ribosa en comparación con los dNTP convencionales. Por tanto, aunque para el ARN los nucleótidos naturales son ribonucleótidos (es decir, ATP, GTP, CTP, UTP, colectivamente rNTP), puesto que estos nucleótidos tienen un grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar, que, en comparación, está ausente en los dNTP, como se usa en el presente documento, los ribonucleótidos son nucleótidos no convencionales como sustratos para las ADN polimerasas. Como se usa en el presente documento, los nucleótidos no convencionales incluyen, pero no están limitados a, compuestos usados como terminadores para la secuenciación de ácidos nucleicos. Los compuestos terminadores ejemplares incluyen, pero no están limitados a, los compuestos que tienen una estructura 2',3' didesoxi y se denominan didesoxinucleósidos trifosfato. Los didesoxinucleósidos trifosfato ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP se denominan colectivamente ddNTP. Los ejemplos adicionales de compuestos terminadores incluyen análogos de 2'-PO₄ de ribonucleótidos (véase, por ejemplo la publicación de solicitud de EE. UU. n.º 2005/0037991 y 2005/0037398). Otros nucleótidos no convencionales incluyen dNTP de fosforotioato ([α-S]dNTP), 5'-[α-borano]-dNTP, dNTP de [α]-metilfosfonato y ribonucleósidos trifosfato (rNTP). Las bases no convencionales se pueden marcar con isótopos radiactivos, tales como ³²P, ³³P o ³⁵S; marcadores fluorescentes; marcadores quimioluminiscentes; marcadores bioluminiscentes; marcadores con hapteno tales como biotina; o marcadores enzimáticos tales como estreptavidina o avidina. Los marcadores fluorescentes pueden incluir tintes que están cargados negativamente, tales como tintes de la familia de la fluoresceína, o tintes que tienen carga neutra, tales como tintes de la familia de la rodamina, o tintes que están cargados positivamente, tales como tintes de la familia de la cianina. Por ejemplo, los tintes de la familia de la fluoresceína incluyen FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los tintes de la familia de la rodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G y TAMRA. Diversos tintes o nucleótidos marcados con FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, Texas Red y TAMRA están comercializados por Perkin-Elmer (Boston, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA) o Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). Los tintes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 y están comercializados por GE Healthcare UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia en la

ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido o la base de ácido nucleico idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones existentes en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntico" o "identidad" en porcentaje en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad sobre una región especificada)), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si son al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o al menos un 55 % idénticas. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia problema. Opcionalmente, la identidad existe en una región que es de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, o más típicamente en una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos de longitud.

Los términos "similitud" o "similitud en porcentaje", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales o bien similares como se define por una sustitución de aminoácidos conservadora (por ejemplo, un 60 % de similitud, opcionalmente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % similar sobre una región determinada) cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí si son al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o al menos un 55 % similares entre sí. Opcionalmente, esto existe de manera similar en una región que es de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o más típicamente en una región que es de al menos aproximadamente 100 a 500 o 1000 o más aminoácidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias problema. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias problema y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Comúnmente se usan parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula las similitudes o identidades de secuencia en porcentaje para las secuencias problema con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, habitualmente aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200, más habitualmente aproximadamente 100 hasta aproximadamente 150 en las que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas óptimamente. Los procedimientos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1970), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin), o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995)).

Ejemplos de un algoritmo que sea adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (*Nuc. Acids Res.* 25:3389-402, 1977) y Altschul *et al.* (*J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990), respectivamente. El programa informático para realizar análisis por BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincidan o bien satisfagan alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando están alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabras de vecindad (Altschul *et al.*, *supra*). Estos resultados iniciales de palabras de vecindad actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que los contienen. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada

secuencia mientras se pueda incrementar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados, siempre >0) y N (puntuación de penalización para los residuos de emparejamiento erróneo, siempre <0). Para secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae en la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa se desplaza a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada 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 como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valor predeterminado una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y las alineaciones (B) de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915, 1989) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-87, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría por casualidad un emparejamiento entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos. 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 problema con respecto al ácido nucleico de referencia es menos de aproximadamente 0,2, típicamente menos de aproximadamente 0,01 y más típicamente menos de aproximadamente 0,001.

El término "eficacia de transcripción inversa" se refiere a la fracción de moléculas de ARN que se transcriben de manera inversa como ADNc en una reacción de transcripción inversa dada. En determinados modos de realización, las ADN polimerasas mutantes de la invención tienen eficacias de transcripción inversa mejoradas con respecto a las formas no modificadas de estas ADN polimerasas. Es decir, estas ADN polimerasas mutantes transcriben de manera inversa una fracción más alta de moldes de ARN que sus formas no modificadas en un conjunto particular de condiciones de reacción. Sin estar limitada por la teoría, la capacidad de una ADN polimerasa mutante descrita en el presente documento para transcribir de manera inversa una fracción más alta de moldes de ARN se puede deber a una actividad de transcripción inversa incrementada, por ejemplo, una velocidad de incorporación de nucleótidos incrementada y/o una procesividad incrementada de la enzima. Por ejemplo, se puede medir la eficacia de transcripción inversa midiendo el punto de corte (Pc) de una reacción de PCR usando un molde de ARN y comparando el valor de Pc con un valor de Pc de una reacción de control en la que se amplifica un molde de ADN de la misma secuencia (excepto en que los U se reemplazan por T), en la que las amplificaciones de ARN y ADN usan un conjunto de cebadores común y la misma polimerasa, por ejemplo, como se describe en los ejemplos. Una polimerasa problema tiene eficacia de RT mejorada cuando la polimerasa problema tiene un valor de Pc disminuido en comparación con una polimerasa de control cuando se usa ARN como molde, pero tiene un valor de Pc sustancialmente sin cambios con respecto a la polimerasa de control cuando se usa ADN como molde. En algunos modos de realización, una polimerasa de la invención tiene una eficacia de RT mejorada, de modo que el Pc es al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más unidades menos que la polimerasa de control correspondiente en el molde de ARN.

El término "tolerancia al emparejamiento erróneo" se refiere a la capacidad de una polimerasa para tolerar una secuencia que contiene emparejamiento erróneo al extender un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente de molde acoplado (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico. El término "tolerancia al emparejamiento erróneo en 3'" se refiere a la capacidad de una polimerasa para tolerar una secuencia (prácticamente complementaria) que contiene emparejamiento erróneo donde el ácido nucleico que se va a extender (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) tiene un emparejamiento erróneo con su molde en el nucleótido de extremo 3' del cebador. Los emparejamientos erróneos con respecto al molde también se pueden localizar en el penúltimo nucleótido en 3' del cebador, o en otra posición de la secuencia del cebador.

La expresión "discriminación por emparejamiento erróneo" se refiere a la capacidad de una polimerasa para distinguir una secuencia completamente complementaria de una secuencia que contiene emparejamiento erróneo al extender un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera dependiente de molde acoplado (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico. El término "discriminación por emparejamiento erróneo en 3'" se refiere a la capacidad de una polimerasa para distinguir una secuencia completamente complementaria de una secuencia (prácticamente complementaria) que contiene emparejamiento erróneo en la que el ácido nucleico que se va a extender (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) tiene un emparejamiento erróneo en el extremo 3' del ácido nucleico en comparación con el molde al que se hibrida el ácido nucleico. El término "emparejamiento erróneo" se refiere a la existencia de uno o más apareamientos erróneos de bases (u "oposiciones de bases no complementarias") en un tramo de, de otro modo, secuencias formadoras de dúplex complementarias (o potencialmente formadoras de dúplex).

El término "valor de Pc" o valor de "punto de corte" se refiere a un valor que permite la cuantificación de ácidos nucleicos diana de entrada. Se puede determinar el valor de Pc de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada (Van Luu-The, et al., "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction", BioTechniques, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, págs. 287-293). En el procedimiento de la segunda derivada, un Pc corresponde al primer pico de una curva de segunda derivada. Este pico corresponde al comienzo de una fase semilogarítmica. El procedimiento de la segunda derivada calcula un valor de segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia en tiempo real, y únicamente se obtiene un valor. El procedimiento de Pc original se basa en una aproximación diferenciable definida localmente de los valores de intensidad, por ejemplo, mediante una función polinómica. A continuación, se computa la tercera derivada. El valor de Pc es la raíz más pequeña de la tercera derivada. También se puede determinar el Pc usando el procedimiento de punto de ajuste, en el que se determina el Pc mediante la intersección de una paralela a la línea umbral en la región semilogarítmica (Van Luu-The, et al., BioTechniques, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, págs. 287-293). El valor de Pc proporcionado por el instrumento LightCycler ofrecido por Roche se obtiene mediante cálculo de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada.

El término "eficacia de la PCR" se refiere a una indicación de la eficacia de amplificación de ciclo a ciclo. La eficacia de la PCR se calcula para cada condición usando la ecuación: % de eficacia de la PCR = $(10^{(-\text{pendiente})} - 1) \times 100$, en la que la pendiente se calculó mediante regresión lineal con el logaritmo del número de copias representado en el eje y el Pc representado en el eje x. La eficacia de la PCR se puede medir usando un molde de cebador perfectamente emparejado o emparejado erróneamente.

El término "velocidad de extensión de ácidos nucleicos" se refiere a la velocidad a la que un biocatalizador (por ejemplo, una enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similar) extiende un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera independiente de molde o dependiente de molde acoplado (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico. Como ilustración, determinadas ADN polimerasas mutantes descritas en el presente documento tienen velocidades de extensión de ácido nucleico mejoradas con respecto a formas no modificadas de dichas ADN polimerasas, de modo que pueden extender cebadores a velocidades más altas que estas formas no modificadas en un conjunto dado de condiciones de reacción.

El término "tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT" se refiere a la capacidad de una polimerasa para mantener la actividad (actividad de polimerasa o de transcripción inversa) en presencia de una cantidad de un inhibidor que inhibiría la actividad de polimerasa o actividad de transcripción inversa de una polimerasa de control. En algunos modos de realización, la polimerasa mejorada puede tener actividad de polimerasa o de transcripción inversa en presencia de una cantidad del inhibidor que eliminaría esencialmente la actividad de la polimerasa de control. Una "polimerasa de control" se refiere a una polimerasa que comprende una isoleucina (I) correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1, pero que, de otro modo, es idéntica a la polimerasa mejorada.

El término "sonda de 5'-nucleasa" se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un resto de marcado emisor de luz y que se usa en una reacción de 5'-nucleasa para lograr la detección de ácidos nucleicos diana. En algunos modos de realización, por ejemplo, una sonda de 5'-nucleasa incluye solamente un único resto emisor de luz (por ejemplo, un tinte fluorescente, etc.). En determinados modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa incluyen regiones de autocomplementariedad, de modo que las sondas pueden formar estructuras de horquilla en condiciones seleccionadas. Para ilustrar adicionalmente, en algunos modos de realización una sonda de 5'-nucleasa comprende al menos dos restos de marcado y emite radiación de intensidad incrementada, después de que uno de los dos marcadores se escinde o, de otro modo, se separa del oligonucleótido. En determinados modos de realización, se marca una sonda de 5'-nucleasa con dos tintes fluorescentes diferentes, por ejemplo, un tinte indicador de extremo 5' y el resto o tinte extintor de extremo 3'. En algunos modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa se marcan en una o más posiciones distintas de, o además de, las posiciones de extremo. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce típicamente entre los dos fluoróforos, de modo que la emisión fluorescente del tinte indicador se extingue al menos en parte. Durante un etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, se escinde una sonda de 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico molde mediante la actividad de nucleasa de 5' a 3' de, por ejemplo, una Taq polimerasa u otra polimerasa que tenga esta actividad, de modo que la emisión fluorescente del tinte indicador ya no se extingue. Sondas de 5'-nucleasa ejemplares también se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.210.015, la patente de EE. UU. n.º 5.994.056 y la patente de EE. UU. n.º 6.171.785. En otros modos de realización, una sonda de 5'-nucleasa se puede marcar con dos o más tintes indicadores diferentes y un resto o tinte extintor de extremo 3'.

El término "FRET" o "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" o "transferencia de energía por resonancia de Förster" se refiere a una transferencia de energía entre al menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado extintor). El donador transfiere típicamente la energía al aceptor cuando se excita el donador mediante radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptor reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente. Cuando el aceptor es un extintor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Si un fluoróforo particular actúa como un donante o como un aceptor depende de las propiedades del otro miembro del par de FRET. Los pares de donador-aceptor usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ)

(Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated ADN Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** representa una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del dominio de polimerasa de ADN polimerasas ejemplares de diversas especies de bacterias: Z05 de *Thermus* sp. (Z05) (SEQ ID NO: 12), *Thermus aquaticus* (Taq) (SEQ ID NO: 13), *Thermus filiformis* (Tfi) (SEQ ID NO: 14), *Thermus flavus* (Tfl) (SEQ ID NO: 15), sps17 de *Thermus* sp. (Sps17) (SEQ ID NO: 16), *Thermus thermophilus* (Tth) (SEQ ID NO: 17), *Thermus caldophilus* (Tca) (SEQ ID NO: 18), *Thermotoga maritima* (Tma) (SEQ ID NO: 19), *Thermotoga neopolitana* (Tne) (SEQ ID NO: 20), *Thermosipho africanus* (Taf) (SEQ ID NO: 21), *Deinococcus radiodurans* (Dra) (SEQ ID NO: 23), *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (SEQ ID NO: 24) y *Bacillus caldotenax* (Bca) (SEQ ID NO: 25). Además, las regiones de polipéptidos mostradas comprenden el motivo aminoacídico E-X₁-X₂-X₃-X₄-I-X₅-X₆-X₇-F-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO: 26), cuyas posiciones variables se definen además en el presente documento. Este motivo está resaltado en negrita para cada secuencia de polimerasa. Las posiciones de aminoácidos susceptibles de mutación se indican con un asterisco (*). Los huecos en las alineaciones se indican con un punto (.).

La **figura 2** proporciona identidades de secuencia entre las siguientes enzimas ADN polimerasa I: ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi); ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl); ADN polimerasa sps17 de *Thermus* sp. (Sps17); ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth); ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca); ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra); ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma); ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne); ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf); ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst); y ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca). **(A)** Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05); y **(B)** identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05.

La **figura 3** proporciona identidades de secuencia entre diversas enzimas ADN polimerasa I de *Thermus* sp: ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05); ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq); ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi); ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl); ADN polimerasa sps17 de *Thermus* sp. (Sps17); ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth); y ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca). **(A)** Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05); y **(B)** identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona ADN polimerasas mejoradas en las que se han mutado uno o más aminoácidos del dominio de polimerasa en relación con una ADN polimerasa funcional. Las ADN polimerasas de la invención son enzimas activas que tienen eficacia de transcriptasa inversa incrementada (por ejemplo, en presencia de cationes divalentes de Mn²⁺ y Mg²⁺) con respecto a la forma no modificada de la polimerasa. También pueden tener tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT incrementadas. Las ADN polimerasas mutantes se pueden usar en concentraciones más bajas para un rendimiento superior o equivalente al de las enzimas precursoras. Las ADN polimerasas mutantes pueden tener eficacia de transcriptasa inversa incrementada mientras que retienen sustancialmente la misma actividad de polimerasa dependiente de ADN con respecto a una polimerasa no modificada o de control. La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Las ADN polimerasas que realizan más eficazmente la transcripción inversa son útiles, por ejemplo, en una variedad de aplicaciones que implican ensayos que emplean RT-PCR para detectar y/o cuantificar dianas de ARN. Por lo tanto, las ADN polimerasas son útiles en una variedad de aplicaciones que implican la extensión de polinucleótidos, así como la transcripción inversa o amplificación de moldes de polinucleótido, incluyendo, por ejemplo, aplicaciones en estudios de ADN recombinante y en el diagnóstico médico de enfermedades. Las ADN polimerasas mutantes también son particularmente útiles, debido a su tolerancia para los emparejamientos erróneos, para detectar dianas que posiblemente tengan secuencias variables (por ejemplo, dianas víricas, o marcadores genéticos de cáncer y otras enfermedades).

En el presente documento se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

Glu-X₁-X₂-X₃-X₄-Ile-X₅-X₆-X₇-Phe-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (también denominado en el presente documento en el código de una letra E-X₁-X₂-X₃-X₄-I-X₅-X₆-X₇-F-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄) (SEQ ID NO: 8); en el que:

X₁ es Ala (A) o Thr (T);

X₂ es Val (V), Gln (Q), Ala (A), Glu (E) o Lys (K);

X₃ es Ala (A), Lys (K), Thr (T) o Glu (E);

X₄ es Phe (F), Met (M) o Ile (I);

X₅ es Glu (E), Val (V), Ile (I) o Asp (D);

5 X₆ es Arg (R), Asn (N), Ser (S) o Ile (I);

X₇ es cualquier aminoácido distinto de Tyr (Y);

10 X₈ es Gln (Q), Val (V), Thr (T), Arg (R), Ala (A) o Glu (E);

X₉ es Ser (S), Leu (L), Tyr (Y) o Thr (T);

X₁₀ es Phe (F) o Tyr (Y);

15 X₁₁ es Pro (P) o Lys (K);

X₁₂ es Lys (K) o Gly (G);

20 X₁₃ es Val (V) o Ile (I);

X₁₄ es Arg (R), Phe (F) o Lys (K).

En el que X₇ se puede seleccionar de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, L, M o H.

25 En el presente documento se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

Glu-Ala-X₂-X₃-X₄-Ile-X₅-X₆-X₇-Phe-X₈-X₉-X₁₀-Pro-Lys-Val-Arg (también denominado en el presente documento en el código de una letra E-A-X₂-X₃-X₄-I-X₅-X₆-X₇-F-X₈-X₉-X₁₀-P-K-V-R) (SEQ ID NO: 9), en el que:

30 X₂ es Val (V), Gln (Q), Ala (A) o Glu (E);

X₃ es Ala (A) o Lys (K);

35 X₄ es Phe (F) o Met (M);

X₅ es Glu (E), Val (V) o Ile (I);

X₆ es Arg (R), Asn (N) o Ser (S);

40 X₇ es cualquier aminoácido distinto de Tyr (Y);

X₈ es Gln (Q), Val (V), Thr (T);

45 X₉ es Ser (S) o Leu (L);

X₁₀ es Phe (F) o Tyr (Y).

En el presente documento se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

50 Glu-Ala-X₂-Ala-Phe-Ile-Glu-Arg-X₇-Phe-Gln-Ser-X₁₀-Pro-Lys-Val-Arg (también denominado en el presente documento en el código de una letra E-A-X₂-A-F-I-E-R-X₇-F-Q-S-X₁₀-P-K-V-R) (SEQ ID NO: 10), en el que:

X₂ es Val (V), Gln (Q) o Ala (A);

55 X₇ es cualquier aminoácido distinto de Tyr (Y);

X₁₀ es Phe (F) o Tyr (Y).

60 En el presente documento se divulgan ADN polimerasas que se pueden caracterizar por tener el siguiente motivo:

Glu-Ala-X₂-Ala-Phe-Ile-Glu-Arg-X₇-Phe-Gln-Ser-X₁₀-Pro-Lys-Val-Arg (también denominado en el presente documento en el código de una letra E-A-X₂-A-F-I-E-R-X₇-F-Q-S-X₁₀-P-K-V-R) (SEQ ID NO: 11), en el que:

65 X₂ es Val (V), Gln (Q) o Ala (A);

X₇ es Phe (F);

X₁₀ es Phe (F) o Tyr (Y).

- 5 Este motivo está presente en el dominio de los "dedos" (02 hélice alfa) de muchas ADN polimerasas dependientes de ADN de tipo A de la familia, particularmente ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas (Li *et al.*, *EMBO J.* 17:7514-7525, 1998). Por ejemplo, la figura 1 muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de una región del dominio de los "dedos" de las ADN polimerasas de diversas especies de bacterias: *Bacillus caldotenax*, *Bacillus stearothermophilus*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermosipho africanus*, *Thermotoga maritima*,
10 *Thermotoga neopolitana*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, Sps17 de *Thermus* sp., Z05 de *Thermus* sp. y *Thermus thermophilus*. Como se muestra, la secuencia natural correspondiente al motivo anterior está presente en cada una de estas polimerasas, indicando una función conservada de esta región de la polimerasa. La figura 2 proporciona identidades de secuencia entre estas ADN polimerasas.
- 15 Por consiguiente, la divulgación proporciona una polimerasa que comprende la SEQ ID NO:8, 9, 10 u 11, que tiene actividad y/o características mejoradas descritas en el presente documento, y en la que la ADN polimerasa es de otro modo una ADN polimerasa natural, tal como, por ejemplo, una polimerasa de cualquiera de las especies de bacterias termófilas enumeradas anteriormente o es sustancialmente idéntica a dicha ADN polimerasa natural. Por ejemplo, la polimerasa puede comprender la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y es al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 %
20 idéntica a la SEQ ID NO: 1. En una variación, la forma no modificada de la polimerasa es de una especie del género *Thermus*. También se divulga que la polimerasa no modificada es de una especie termófila distinta de *Thermus*, por ejemplo, *Thermotoga*. La secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos completa para numerosas ADN polimerasas termoestables está disponible. Las secuencias de cada una de *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), Z05 de *Thermus* sp., sps17 de *Thermus* sp., *Thermotoga maritima* (Tma) y *Thermosipho africanus* (Taf) se
25 han publicado en la publicación de patente Internacional PCT n.º WO 92/06200. En particular, el documento WO 92/06200 divulga la secuencia de aminoácidos natural de una ADN polimerasa termoestable derivada de la Z05 de *Thermus* sp. (SEQ ID NO: 1) de la siguiente manera:

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

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp
 305 310 315 320
 Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Lys Glu Gly Arg Val His Arg
 325 330 335
 Ala Lys Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 340 345 350
 Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp
 355 360 365
 Leu Ala Pro Ser Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro
 370 375 380
 Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
 385 390 395 400
 Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Gln Gln
 405 410 415
 Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
 420 425 430
 Gln Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
 435 440 445
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Lys Ala Leu Ser Leu Glu
 450 455 460
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
 485 490 495
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
 500 505 510
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 515 520 525
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
 530 535 540
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Gly Leu Val His Pro Arg Thr Gly
 545 550 555 560
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
 565 570 575
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Ile Arg Thr Pro Leu
 580 585 590
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
 595 600 605

```

Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 610                      615                      620

Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 625                      630                      635                      640

His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Ser Pro Glu Ala Val
                      645                      650                      655

Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
                      660                      665                      670

Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 675                      680                      685

Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 690                      695                      700

Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Arg Gly
 705                      710                      715                      720

Tyr Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn
                      725                      730                      735

Ala Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn
                      740                      745                      750

Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 755                      760                      765

Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 770                      775                      780

Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
 785                      790                      795                      800

Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
                      805                      810                      815

Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 820                      825                      830

Lys Gly

```

La secuencia para la ADN polimerasa de *Thermus flavus* se ha publicado en Akhmetzjanov y Vakhitov (*Nucleic Acids Research* 20:5839, 1992). La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus caldophilus* se encuentra en el n.º de acceso de EMBL/GenBank U62584. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus filiformis* se puede recuperar del n.º 42380 del depósito de ATCC usando, por ejemplo, los procedimientos proporcionados en la patente de EE. UU. n.º 4.889.818, así como la información de secuencia proporcionada en la tabla 1. La secuencia de la ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana* es del n.º de acceso de la base de datos de patentes de GeneSeq R98144 y el documento de PCT WO 97/09451. La secuencia de la ADN polimerasa termoestable de *Bacillus caldotenax* (se describe en, por ejemplo, Uemori et al. (*J Biochem (Tokyo)* 113 (3): 401-410, 1993; véase también la base de datos Swiss-Prot n.º de acceso Q04957 y números de acceso de GenBank D12982 y BAA02361). Ejemplos de formas no modificadas de ADN polimerasas que se pueden modificar como se describe en el presente documento se describen también, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 6.228.628, 6.346.379, 7.030.220, 6.881.559, 6.794.177, 6.468.775; y en las patentes de EE. UU. n.º 7.148.049, 7.179.590, 7.410.782, 7.378.262.

También son susceptibles a las mutaciones descritas en el presente documento ADN polimerasas funcionales que se han modificado previamente (por ejemplo, mediante delección, adición o sustitución de aminoácidos). Dichas polimerasas modificadas funcionales retienen el motivo aminoacídico de SEQ ID NO: 8 (o un motivo de SEQ ID NO: 9, 10 u 11) y opcionalmente el motivo aminoacídico de SEQ ID NO: 38. Por tanto, las ADN polimerasas no modificadas adecuadas también incluyen variantes funcionales de polimerasas naturales. Dichas variantes tienen típicamente una similitud o identidad de secuencia sustancial con respecto a la polimerasa natural, típicamente de al menos un 80 % de identidad de secuencia y más típicamente de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia.

Una polimerasa, además de tener un dominio de polimerasa que comprende las SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, puede comprender también un dominio de nucleasa (por ejemplo, correspondiente a las posiciones 1 a 291 de Z05).

Una polimerasa puede ser una polimerasa quimérica, es decir, que comprende regiones de polipéptidos de dos o más enzimas. Los ejemplos de dichas ADN polimerasas quiméricas se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.228.628. Son particularmente adecuadas las ADN polimerasas de la familia CS quiméricas, que incluyen las polimerasas CS5 y CS6 y variantes de las mismas que tienen identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (típicamente al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos y más típicamente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos) y, por tanto, se pueden modificar para contener la SEQ ID NO: 8.

Las ADN polimerasas CS5 y CS6 son enzimas quiméricas derivadas de las ADN polimerasas Z05 de *Thermus* sp. y *Thermotoga maritima* (*Tma*). Comprenden el dominio de 5'-nucleasa de extremo N de la enzima de *Thermus* y los dominios de polimerasa y 3'-5' exonucleasa C-terminal de la enzima de *Tma*. Estas enzimas tienen actividad de transcriptasa inversa eficaz, pueden extender cebadores que contienen análogos de nucleótidos y pueden incorporar dNTP de alfa-fosforotioato, dUTP, dITP y también dNTP marcados de la familia de los tintes de fluoresceína y cianina. Las polimerasas CS5 y CS6 también son enzimas de PCR activadas por Mg²⁺ eficaces. Las polimerasas quiméricas CS5 y CS6 se describen además, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.148.049.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos únicos. Las ADN polimerasas proporcionadas en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos en el sitio activo en relación con la polimerasa no modificada. La(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos puede(n) comprender al menos la posición X₇ del motivo expuesto en la SEQ ID NO: 8 (o un motivo de SEQ ID NO: 9, 10 u 11). La sustitución de aminoácidos en esta posición confiere eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT incrementadas, produciendo una ADN polimerasa mutante con una eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT incrementadas con respecto a la polimerasa no modificada. Típicamente, el aminoácido en la posición X₇ está sustituido con un aminoácido que no se corresponde con la secuencia natural en el motivo expuesto en SEQ ID NO: 8 (o un motivo de SEQ ID NO: 9, 10 u 11). Por tanto, típicamente, el aminoácido en la posición X₇, si está sustituido, no es Tyr (Y), ya que Y aparece en esta posición en las polimerasas naturales (véase, por ejemplo, la figura 1). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, I, N, Q, D, E, K, L, M, o H en la posición X₇. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir fenilalanina (F) en la posición X₇. Se puede(n) determinar otra(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos adecuada(s) en uno o más de los sitios identificados usando, por ejemplo, procedimientos conocidos de mutagénesis dirigida a sitio y determinación del rendimiento de extensión de polinucleótidos en ensayos descritos además en el presente documento o, de otro modo, conocidos por expertos en la técnica.

La polimerasa divulgada en el presente documento puede comprender la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y puede comprender además uno o más cambios de aminoácidos adicionales (por ejemplo, mediante delección, adición o sustitución de aminoácidos) en comparación con una polimerasa natural. Dichas polimerasas retienen el motivo aminoacídico de SEQ ID NO: 8 (o un motivo de SEQ ID NO: 9, 10 u 11) y comprenden además el motivo aminoacídico de SEQ ID NO: 38 (correspondiente a la mutación D580X de Z05 (SEQ ID NO: 1)) como sigue:

Thr-Gly-Arg-Leu-Ser-Ser-X_{b7}-X_{b8}-Pro-Asn-Leu-Gln-Asn (también denominado en el presente documento en el código de una letra T-G-R-L-S-S-X_{b7}-X_{b8}-P-N-L-Q-N) (SEQ ID NO:38); en el que

X₇ es Ser (S) o Thr (T); y

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

La mutación caracterizada por la SEQ ID NO: 38 se analiza en más detalle, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2009/0148891. Dichas polimerasas variantes funcionales típicamente tendrán una identidad o similitud de secuencia sustancial con la polimerasa natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), típicamente al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos y más típicamente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

También se divulgan en el presente documento polimerasas que comprenden la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y que comprenden además uno o más cambios de aminoácidos adicionales (por ejemplo, mediante delección, adición o sustitución de aminoácidos) en comparación con una polimerasa natural. En algunos aspectos, dichas polimerasas retienen el motivo aminoacídico de SEQ ID NO: 8 (o un motivo de SEQ ID NO: 9, 10 u 11) y comprenden además el motivo aminoacídico de SEQ ID NO: 29 (correspondiente a la mutación I709X de Z05 (SEQ ID NO: 1) como sigue:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-Gly-Tyr-Val-X₁₄-Thr-Leu (también denominado en el presente documento en el código de una letra X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-G-Y-V-X₁₄-T-L) (SEQ ID NO:29); en el que

X₁ es Ala (A), Asp (D), Ser (S), Glu (E), Arg (R) o Gln (Q);

X₂ es Trp (W) o Tyr (Y);

X₃ es cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Leu (L) o Met (M);

X₄ es Glu (E), Ala (A), Gln (Q), Lys (K), Asn (N) o Asp (D);

X₅ es Lys (K), Gly (G), Arg (R), Gln (Q), His (H) o Asn (N);

X₆ es Thr (T), Val (V), Met (M) o Ile (I);

X₇ es Leu (L), Val (V) o Lys (K);

X₈ es Glu (E), Ser (S), Ala (A), Asp (D) o Gln (Q);

X₉ es Glu (E) o Phe (F);

X₁₀ es Gly (G) o Ala (A);

X₁₁ es Arg (R) o Lys (K);

X₁₂ es Lys (K), Arg (R), Glu (E), Thr (T) o Gln (Q);

X₁₃ es Arg (R), Lys (K) o His (H); y

X₁₄ es Glu (E), Arg (R) o Thr (T).

Dichas polimerasas variantes funcionales típicamente tendrán una identidad o similitud de secuencia sustancial con la polimerasa natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), típicamente al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos y más típicamente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

También se divulgan ADN polimerasas que comprenden una sustitución de aminoácidos en la posición X₇ (por ejemplo, como en un motivo seleccionado de SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11) y que comprenden una sustitución de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 38 y la SEQ ID NO: 29.

En el presente documento, se puede sustituir el aminoácido en la posición X₇ con un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, y el aminoácido en la posición X₈ se puede sustituir con un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 38. Por tanto, el aminoácido en la posición X₇ puede ser cualquier aminoácido distinto de Tyr (Y) y el aminoácido en la posición X₈ puede ser cualquier aminoácido distinto de Asp (D) o Glu (E). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (N), arginina (R) y lisina (K) en la posición X₈ de SEQ ID NO: 38. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir independientemente fenilalanina (F) en la posición X₇ de SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y glicina (G) en la posición X₈ de SEQ ID NO: 38.

Se puede sustituir el aminoácido en la posición X₇ por un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, y el aminoácido en la posición X₃ (de la SEQ ID NO: 29) se puede sustituir por un aminoácido como se expone en la SEQ ID NO: 29. Por tanto, el aminoácido en la posición X₇ puede ser cualquier aminoácido distinto de Tyr (F) y el aminoácido en la posición X₃ puede ser cualquier aminoácido distinto de Ile (I), Leu (L) o Met (M). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir lisina (K), arginina (R), serina (S), glicina (G) o alanina (A) en la posición X₃ de SEQ ID NO: 29. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir independientemente fenilalanina (F) en la posición X₈ de SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11 y lisina (K) en la posición X₃ de SEQ ID NO: 29.

Se puede(n) determinar otra(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos adecuada(s) en uno o más de los sitios identificados usando, por ejemplo, procedimientos conocidos de mutagénesis dirigida a sitio y determinación del rendimiento de extensión de polinucleótidos en ensayos descritos además en el presente documento o, de otro

modo, conocidos por expertos en la técnica, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos descritas en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0148891 y 2009/0280539

Debido a que varía la longitud precisa de las ADN polimerasas, las posiciones de aminoácidos precisas correspondientes a cada una de X₇ (SEQ ID NO: 8), X₈ (SEQ ID NO: 38) y X₃ (SEQ ID NO: 29) pueden variar dependiendo de la polimerasa mutante particular usada. Los programas de alineación de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos están fácilmente disponibles (véanse, por ejemplo, a los que se hace referencia *supra*) y, dados los motivos particulares identificados en el presente documento, sirven para ayudar a la identificación de los aminoácidos exactos (y codones correspondientes) para la modificación de acuerdo con la presente invención. Las posiciones correspondientes a cada una de X₇, X₈ y X₃ se muestran en la tabla 1 para ADN polimerasas termoestables y ADN polimerasas termoestables quiméricas representativas de especies termófilas ejemplares.

Tabla 1. Posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones del motivo X₇ (por ejemplo, de SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11), X₈ (de SEQ ID NO: 38) y X₃ (de SEQ ID NO: 29) en polimerasas ejemplares.

<u>Organismo o secuencia quimérica</u>	<u>Posición de aminoácidos</u>		
	X ₇	X ₈ (de SEQ ID NO: 38)	X ₃ (de SEQ ID NO: 29)
Consenso (SEQ ID NO:)			
<i>T. thermophilus</i>	698	580	709
<i>T. caldophilus</i>	698	580	709
Z05 de <i>T. sp.</i> (1)	698	580	709
<i>T. aquaticus</i>	696	578	707
<i>T. flavus</i>	695	577	706
<i>T. filiformis</i>	694	576	705
Sps17 de <i>T. sp.</i>	694	576	705
<i>T. maritima</i>	759	640	770
<i>T. neapolitana</i>	759	640	770
<i>T. africanus</i>	758	639	769
<i>B. caldotenax</i>	740	621	751
<i>B. stearothermophilus</i>	739	620	750
CS5	759	640	770
CS6	759	640	770

La ADN polimerasa puede derivarse de la ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma (por ejemplo, que porte la mutación D580G o similar). Como se ha indicado anteriormente, en la ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* la posición X₇ corresponde a tirosina (T) en la posición 698; la posición X₈ corresponde a aspartato (D) en la posición 580 y la posición X₃ corresponde a isoleucina (I) en la posición 709. La polimerasa mutante puede comprender al menos una sustitución de aminoácido, con respecto a una ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* (o una ADN polimerasa que es sustancialmente idéntica, por ejemplo, al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1), en Y698, I709 y/o D580. Por tanto, típicamente, el aminoácido en la posición 698 no es Y. El aminoácido en la posición 698 se puede seleccionar de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, I, N, Q, D, E, K, L, M o H. El residuo de aminoácido en la posición 698 de SEQ ID NO: 1 puede ser fenilalanina (F). Los residuos de aminoácidos en la posición D580 de SEQ ID NO: 1 se pueden seleccionar de leucina (L), glicina (G), treonina (T), glutamina (Q), alanina (A), serina (S), asparagina (N), arginina (R) y lisina (K). Por tanto, el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 puede ser glicina (G). Además, el aminoácido en la posición 709 de SEQ ID NO: 1 no puede ser I. El aminoácido en la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona de G, A, V, R, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, L, M o H. El residuo de aminoácido en la posición 709 puede ser K, R, S, G o A. El aminoácido en la posición 709 de SEQ ID NO: 1 puede ser K.

Los mutantes de ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* ejemplares incluyen los que comprenden las sustituciones de aminoácidos Y698F y/o I709K (o I709R, I709S, I709G, I709A) y/o D580G. La ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácidos Y698F y D580G. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácidos Y698F y I709K. En algunos modos de realización, la ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* mutante comprende, por ejemplo, las sustituciones de residuos de aminoácidos Y698F, I709K y D580G. La ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.* mutante comprende, por ejemplo las sustituciones de residuos de aminoácidos seleccionadas independientemente de Y698F, I709K y/o D580G.

Las sustituciones en el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 descritas anteriormente puede dar como resultado ADN polimerasas que tienen eficacia de transcripción inversa mejorada (es decir, incrementada), actividad de RT-PCR incrementada (por ejemplo, amplificación más eficaz de un molde de ARN sin comprometer la eficacia de la PCR en un molde de ADN), eficacia de RT-PCR incrementada en presencia de Mg^{2+} , actividad de transcriptasa inversa incrementada en presencia de inhibidores (por ejemplo, productos de descomposición de hemoglobina, tales como hemina y/o heparina), velocidad de extensión incrementada y tolerancia al emparejamiento erróneo en 3' mejorada en comparación con una polimerasa de control (véase la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 61/474.160). Por tanto, se espera que las polimerasas mejoradas que comprenden sustituciones en el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 descritas en el presente documento también tengan las propiedades mejoradas descritas anteriormente.

Además de las mutaciones de los motivos de SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 29 y 38 descritas en el presente documento, las ADN polimerasas de la presente invención también pueden incluir otras modificaciones no sustitutivas. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, modificaciones covalentes conocidas en la técnica para conferir una ventaja adicional en aplicaciones que comprenden extensión de polinucleótidos. Por ejemplo, una de dichas modificaciones es una modificación covalente reversible térmicamente que inactiva la enzima, pero que se invierte para activar la enzima tras la incubación a una temperatura elevada, tal como una temperatura usada típicamente para la extensión de polinucleótidos. Los reactivos ejemplares para dichas modificaciones reversibles térmicamente se describen en las patentes de EE. UU. n.º 5.773.258 y 5.677.152.

Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden construir mutando las secuencias de ADN que codifican la polimerasa no modificada correspondiente (por ejemplo, una polimerasa natural o una variante correspondiente de la que se deriva la polimerasa de la invención), tal como usando técnicas denominadas comúnmente mutagénesis dirigida a sitio. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la forma no modificada de la polimerasa se pueden mutar mediante una variedad de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *PCR Strategies* (M. A. Innis, D. H. Gelfand y J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) en el capítulo 14; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990).

A modo de ejemplo no limitante, se puede emplear el sistema de dos cebadores, utilizado en el kit de mutagénesis dirigida a sitio por transformador de Clontech, para introducir mutantes dirigidos a sitio en un polinucleótido que codifica una forma no modificada de la polimerasa. Después de la desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores al plásmido; uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida a sitio deseada, el otro contiene una mutación en otro punto del plásmido que da como resultado la eliminación de un sitio de restricción. A continuación, se lleva a cabo la síntesis de la segunda cadena, enlazando firmemente estas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de *E. coli*. El ADN plasmídico se aísla de las bacterias transformadas, se restringe con la enzima de restricción pertinente (linealizando de este modo los plásmidos no mutados), y, a continuación, se retransforma en *E. coli*. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin la necesidad de subclonar o generar fagémidos monocatenarios. El firme enlace de las dos mutaciones y la linealización posterior de los plásmidos no mutados dan como resultado una eficacia de mutación alta y permiten un cribado mínimo. Después de la síntesis del cebador de sitio de restricción inicial, este procedimiento requiere el uso de únicamente un nuevo tipo de cebador por sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, se puede sintetizar un conjunto de cebadores oligonucleotídicos "degenerados diseñados" para introducir simultáneamente todas las mutaciones deseadas en un sitio dado. Los transformantes se pueden cribar mediante secuenciación del ADN plasmídico a través de la región mutagenizada para identificar y clasificar clones mutantes. A continuación, cada ADN mutante se puede restringir y analizar mediante electroforesis, tal como, por ejemplo, en un gel de potenciación de la detección de mutaciones (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) para confirmar que no se han producido otras alteraciones en la secuencia (mediante comparación por desplazamiento de banda con respecto al control no mutagenizado). De forma alternativa, se puede secuenciar toda la región de ADN para confirmar que no se ha producido ningún acontecimiento mutacional adicional fuera de la región diana.

Las ADN polimerasas con más de un aminoácido sustituido se pueden generar de diversas maneras. En el caso de aminoácidos localizados cerca entre sí en la cadena polipeptídica, se pueden mutar simultáneamente usando un oligonucleótido que codifique todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos se localizan a cierta distancia entre sí (separados en más de diez aminoácidos, por ejemplo) es más difícil generar un único oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, se puede emplear uno de dos procedimientos alternativos. En el primer procedimiento se genera un oligonucleótido separado para cada aminoácido que se va a sustituir. A continuación, se hibridan simultáneamente los oligonucleótidos al ADN molde monocatenario y la segunda cadena de ADN que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Un procedimiento alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es como se describe para los mutantes únicos: se usa el ADN que codifica la polimerasa no modificada para el molde, se hibrida un oligonucleótido que codifica la(s) primera(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos deseada(s) a este molde, y, a continuación, se genera la molécula de ADN de heterodúplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como molde. Por tanto, este molde ya contiene una o más mutaciones. A continuación, el

oligonucleótido que codifica las sustituciones de aminoácidos deseadas adicionales se hibrida a este molde y la cadena de ADN resultante codifica ahora mutaciones tanto de la primera como de la segunda ronda de mutagénesis. Este ADN resultante se puede usar como un molde en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente. De forma alternativa, se puede utilizar el procedimiento de mutagénesis multisitio de Seyfang y Jin (Anal. Biochem. 324:285-291. 2004).

Por consiguiente, también se proporcionan ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de las ADN polimerasas de la presente invención. Usando un ácido nucleico de la presente invención, que codifica una ADN polimerasa, se pueden preparar una variedad de vectores. Se puede usar cualquier vector que contenga secuencias de control y replicón que deriven de una especie compatible con la célula huésped en la práctica de la invención. En general, los vectores de expresión incluyen regiones de ácido nucleico reguladoras transcriptionales y traduccionales enlazadas de manera funcional al ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa. El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada de manera funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Además, el vector puede contener un elemento retrorregulador positivo (PRE) para potenciar la semivida del ARNm transcrito (véase la patente de EE. UU. n.º 4.666.848). Las regiones de ácido nucleico reguladoras transcriptionales y traduccionales serán, en general, apropiadas para la célula huésped usada para expresar la polimerasa. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. En general, las secuencias reguladoras transcriptionales y traduccionales pueden incluir, por ejemplo, secuencias promotoras, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y parada transcripcionales, secuencias de inicio y parada traduccionales y secuencias potenciadoras o activadoras. En modos de realización típicos, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias de inicio y parada transcripcionales. Los vectores también incluyen típicamente una región de policonector que contiene varios sitios de restricción para la inserción de ADN exógeno. En determinados modos de realización, se usan "señales de fusión" para facilitar la purificación y, si se desea, la retirada posterior de la secuencia etiqueta/señal, por ejemplo, la "etiqueta His". Sin embargo, en general, son innecesarias cuando se purifica una proteína termoactiva y/o termoestable de un huésped mesófilo (por ejemplo, *E. coli*) donde se puede emplear una "etapa de calor". La construcción de vectores adecuados que contienen ADN que codifica secuencias de replicación, secuencias reguladoras, genes de selección de fenotipo y la polimerasa de interés se preparan usando procedimientos de ADN recombinante estándar. Los plásmidos aislados, vectores víricos y fragmentos de ADN se escinden, adaptan y ligan entre sí en un orden específico para generar los vectores deseados, como se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, 2.ª ed. 1989)).

El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada. Los genes de selección adecuados pueden incluir, por ejemplo, genes que codifican la resistencia a tetraciclina y/o ampicilina, que posibilita que las células transformadas con estos vectores crezcan en presencia de estos antibióticos.

Un ácido nucleico que codifica una ADN polimerasa se puede introducir en una célula, ya sea solo o en combinación con un vector. Por "introducir en" o equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la posterior integración, amplificación y/o expresión del ácido nucleico. El procedimiento de introducción está dictado en gran medida por el tipo de célula seleccionada como diana. Los procedimientos ejemplares incluyen precipitación con CaPO₄, fusión de liposomas, LIPOFECTIN®, electroporación, infección vírica y similares.

Se pueden usar típicamente procariotas como células huésped para las etapas de clonación iniciales. Son particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la producción de moldes de ADN monocatenario usados para la mutagénesis dirigida a sitio, para cribar simultáneamente muchos mutantes y para la secuenciación de ADN de los mutantes generados. Las células huésped procariotas adecuadas incluyen la cepa 94 de *E. coli* K12 (ATCC n.º 31,446), la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC n.º 27.325), la cepa DG116 de *E. coli* K12 (ATCC n.º 53.606), *E. coli* X1776 (ATCC n.º 31.537) y *E. coli* B; sin embargo, se pueden usar como huéspedes todas de muchas otras cepas de *E. coli*, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539 y muchas otras especies y géneros de procariotas, que incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, otras enterobacterias como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans* y diversas especies de *Pseudomonas*. Las células huésped procariotas u otras células huésped con paredes celulares rígidas se transforman típicamente usando el procedimiento de cloruro de calcio como se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al., *supra*. De forma alternativa, se puede usar electroporación para la transformación de estas células. Las técnicas de transformación de procariotas se exponen, por ejemplo, en Dower, en *Genetic Engineering, Principles and Methods* 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan et al., *Meth. Enzymol.*, 204:63, 1991. Los plásmidos usados típicamente para la transformación de *E. coli* incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pUC18, pUC119 y Bluescript M13, todos los cuales se describen en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook et al., *supra*. Sin embargo, también están disponibles muchos otros vectores adecuados.

Las ADN polimerasas de la presente invención se producen típicamente cultivando una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la ADN polimerasa. Los procedimientos de cultivo de células huésped transformadas en condiciones adecuadas para la expresión de proteínas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). Las células huésped adecuadas para la producción de las polimerasas a partir de vectores plasmídicos que contienen promotor pL lambda incluyen la cepa DG116 de *E. coli* (ATCC n.º 53606) (véase la patente de EE. UU. n.º 5.079.352 y Lawyer, F.C. *et al.*, *PCR Methods and Applications* 2:275-87, 1993). Después de la expresión, la polimerasa se puede recoger y aislar. Los procedimientos para purificar la ADN polimerasa termoestable se describen, por ejemplo, en Lawyer *et al.*, *supra*. Una vez purificada, se puede someter a prueba la capacidad de las ADN polimerasas para tener eficacia de RT mejorada, tolerancia al emparejamiento erróneo incrementada, velocidad de extensión y/o tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT (por ejemplo, como se describe en los ejemplos).

Las ADN polimerasas mejoradas de la presente invención se pueden usar para cualquier propósito en el que dicha actividad enzimática sea necesaria o deseada. Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos de extensión de polinucleótidos (por ejemplo, PCR) usando las polimerasas. Las condiciones adecuadas para la extensión de polinucleótidos son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; véase también Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (4.^a ed., John Wiley & Sons 1999). En general, un cebador se hibrida a un ácido nucleico diana para formar un complejo cebador-molde. El complejo cebador-molde se pone en contacto con la ADN polimerasa y nucleósidos trifosfato en un ambiente adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos al extremo 3' del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido complementario al ácido nucleico diana. El cebador puede incluir, por ejemplo, uno o más análogos de nucleótidos. Además, los nucleósidos trifosfato pueden ser nucleótidos convencionales, nucleótidos no convencionales (por ejemplo, ribonucleótidos o nucleótidos marcados) o una mezcla de los mismos. En algunas variaciones, la reacción de extensión de polinucleótidos comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. Las condiciones adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos usando una ADN polimerasa y un par de cebadores también se conocen en la técnica (por ejemplo, PCR amplification methods) (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *supra*; *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics* (Innis *et al.* eds., Academic Press 1999). En otros modos de realización no mutuamente exclusivos, la reacción de extensión de polinucleótidos comprende la transcripción inversa de un molde de ARN (por ejemplo, RT-PCR). En algunos modos de realización, las polimerasas mejoradas encuentran uso en la secuenciación 454 (Margulies, M *et al.* 2005, *Nature*, 437, 376-380).

Opcionalmente, la reacción de extensión del cebador comprende un inhibidor real o potencial de una polimerasa de referencia o no modificada. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir la velocidad de extensión de ácido nucleico y/o la eficacia de transcripción inversa de una polimerasa de referencia o no modificada (de control). El inhibidor puede ser hemoglobina, o un producto de degradación de la misma. Por ejemplo, el producto de degradación de hemoglobina puede ser un producto de descomposición de hemo, tal como hemina, hematoporfirina o bilirrubina. El inhibidor puede ser un quelante de hierro o un pigmento púrpura. El inhibidor puede ser heparina. El inhibidor puede ser un tinte intercalante. El inhibidor puede ser melanina, que se ha descrito como un inhibidor de la polimerasa (véase, por ejemplo, Ekhardt, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 271(3):726-30 (2000)).

Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de moldes de polinucleótido aislados de muestras que comprenden inhibidores de la polimerasa, por ejemplo, tales como sangre. Por ejemplo, las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de hemoglobina, un componente principal de la sangre, o en presencia de un producto de degradación de hemoglobina. La hemoglobina se puede degradar en diversos productos de descomposición de hemo, tales como hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. Por tanto, se pueden usar ADN polimerasas de la presente invención para extender moldes en presencia de productos de degradación de hemoglobina, incluyendo, pero no limitados a, hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. En el presente documento, el producto de degradación de hemoglobina puede ser hemina. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de hemina aproximadamente 0,5 a 20,0 µM, aproximadamente 0,5 a 10,0 µM, aproximadamente 0,5 a 5,0 µM, aproximadamente 1,0 a 10,0 µM, aproximadamente 1,0 a 5,0 µM, aproximadamente 2,0 a 5,0 µM, o aproximadamente 2,0 a 3,0 µM. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de hemina al menos aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0 o más de 20 µM. Los productos de descomposición de hemoglobina incluyen quelantes de hierro y pigmentos púrpura. Por tanto, se pueden usar las ADN polimerasas de la presente invención para extender moldes en presencia de quelantes de hierro y/o pigmentos púrpura. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de cantidades de productos de degradación de hemoglobina que inhibirían la extensión del mismo molde por una ADN polimerasa de referencia o de control.

Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de heparina. La heparina está presente comúnmente como un anticoagulante en muestras aisladas de sangre. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de aproximadamente 1,0 a 400 ng/µl, de 1,0 a 300 ng/µl, de 1,0 a 200 ng/µl, de 5,0 a 400 ng/µl, de 5,0 a 300 ng/µl, de 5,0 a 200 ng/µl, de 10,0 a 400 ng/µl, de 10,0 a 300 ng/µl o de 10,0 a 200 ng/µl de heparina. Las ADN polimerasas de la presente invención se

pueden usar para extender moldes en presencia de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ng/μl o más de 400 ng/μl de heparina. Las ADN polimerasas de la presente invención se pueden usar para extender moldes en presencia de cantidades de heparina que inhibirían la extensión del mismo molde por una ADN polimerasa de referencia o de control.

Una polimerasa mejorada de la invención se puede usar en una reacción de transcripción inversa. La reacción de transcripción inversa se puede llevar a cabo en una mezcla que contenga el molde de ARN, uno o más cebadores y una ADN polimerasa termoestable de la invención. La mezcla de reacción contiene típicamente los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato estándar (dNTP) y un tampón que contiene un catión divalente y un catión monovalente. Los cationes ejemplares incluyen, por ejemplo, Mg^{2+} , aunque otros cationes, tales como Mn^{2+} o Co^{2+} , pueden activar ADN polimerasas. La reacción de transcripción inversa se puede llevar a cabo con una ADN polimerasa termoactiva de la invención. La polimerasa mejorada de la invención puede permitir una amplificación más eficaz de moldes de ARN sin comprometer la amplificación eficaz de un molde de ADN en presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} , como se describe en los ejemplos.

Una polimerasa mejorada de la invención puede incrementar la eficacia de transcripción inversa reduciendo el tiempo de reacción requerido para extender un molde de ARN. Por ejemplo, una polimerasa mejorada descrita en el presente documento puede reducir significativamente el tiempo de reacción requerido para transcribir ARN a ADNc en comparación con una polimerasa de control, incrementando de este modo la eficacia de transcriptasa inversa. Sin estar limitada por la teoría, la polimerasa mejorada puede incrementar la eficacia de RT, por ejemplo, incrementando la actividad de la enzima sobre un molde de ARN, tal como incrementando la velocidad de incorporación de nucleótidos y/o incrementando la procesabilidad de la polimerasa, reduciendo eficazmente de este modo el tiempo de extensión de un molde de ARN o población de moldes de ARN. Los tiempos de reacción para la etapa RT inicial son típicamente del orden de 30 minutos o más a 65 grados C cuando se usa una polimerasa no modificada o de control. Por tanto, la polimerasa mejorada puede transcribir un molde de ARN en ADNc en menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 8 minutos, menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 4 minutos, menos de aproximadamente 3 minutos o menos de aproximadamente 2 minutos a 65 grados C. La polimerasa mejorada puede transcribir un molde de ARN derivado del transcrito JP2-5 del virus de la hepatitis C (VHC), que contiene las primeras 800 bases de la 5'NTR del genotipo 1b del VHC, en ADNc en menos tiempo o más rápido que una polimerasa de control. Por ejemplo, la polimerasa mejorada puede ser capaz de transcribir 240 bases del molde de ARN de JP2-5 del VHC en ADNc de longitud completa en aproximadamente 15 segundos menos, 30 segundos menos, un minuto menos, dos minutos menos, 3 minutos menos, 4 minutos menos, 5 minutos menos o aproximadamente 10 minutos menos que una polimerasa de control en idénticas condiciones de reacción. La polimerasa mejorada puede ser capaz de transcribir 240 bases del molde de ARN de JP2-5 del VHC en ADNc de longitud completa más rápido que una polimerasa de control, por ejemplo, en aproximadamente 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 45 segundos o 60 segundos o más rápido que una polimerasa de control en condiciones de reacción idénticas. Las condiciones de reacción pueden ser las descritas en los ejemplos. Se puede poner en contacto una polimerasa mejorada descrita en el presente documento con un molde de ARN a 65 grados C durante 2 minutos en la mezcla de reacción descrita anteriormente. La etapa de extensión puede ir seguida de amplificación por PCR del molde extendido, como se describe en los ejemplos.

La actividad de RT más eficaz en ADN polimerasas termoestables se ha logrado usando Mn^{2+} como el activador de iones de metal divalentes. Sin embargo, se conoce bien que cuando Mn^{2+} está presente en las reacciones, la fidelidad de las ADN polimerasas es más baja. A menos se esté tratando de generar mutaciones, en general se favorece mantener una fidelidad más alta. Afortunadamente, la mayoría de las aplicaciones convencionales de secuenciación, PCR y RT-PCR, no requieren condiciones de alta fidelidad porque los sistemas de detección buscan, en general, una población de productos. Con la llegada de la siguiente generación de secuenciación, la PCR digital, etc., la fidelidad del producto es más importante y los procedimientos que permiten una síntesis de ADN de fidelidad más alta son críticos. Conseguir una actividad de RT eficaz usando Mg^{2+} como activador de iones de metal divalentes es una excelente manera de incrementar sustancialmente la fidelidad de la ADN polimerasa y permitir una copia más fiable de la diana de ácido nucleico. Por consiguiente, la polimerasa mejorada de la invención puede permitir una extensión y/o amplificación eficaces de moldes de ARN usando Mg^{2+} como activador de iones de metal divalentes, como se describe en los ejemplos.

Debido a que las polimerasas descritas en el presente documento también pueden tener tolerancia al emparejamiento erróneo incrementada, las polimerasas encuentran uso en procedimientos en los que es probable la variación del molde diana y, no obstante, se desea que el molde aún se amplifique independientemente de la variación en el molde diana. Un ejemplo de dichos moldes puede incluir, por ejemplo, secuencias víricas, bacterianas o de otros patógenos. Puede ser deseable determinar simplemente si un sujeto (humano o animal no humano) tiene una infección vírica u otra infección, independientemente de la variante vírica precisa que ha infectado al sujeto. Como ejemplo, se puede usar un par de cebadores para amplificar el VHC usando una polimerasa de la invención y detectar la presencia del VHC aun cuando el virus particular que infecta al sujeto tenga una mutación que da como resultado un emparejamiento erróneo en el sitio de hibridación del cebador.

Los ácidos nucleicos diana pueden proceder de una fuente biológica o sintética. La diana puede ser, por ejemplo,

ADN o ARN. En general, cuando se generan amplicones, los amplicones estarán compuestos de ADN, aunque también se pueden incorporar ribonucleótidos o nucleótidos sintéticos en el amplicón. Cuando se desea detectar un ARN, el procedimiento de amplificación implica típicamente el uso de transcripción inversa, incluyendo, por ejemplo, PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

Las secuencias diana específicas pueden incluir, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), (citomegalovirus (CMV), parvovirus B19, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis C (VHC), virus del papiloma humano (VPH), virus de la encefalitis japonesa (VEJ), virus del Nilo Occidental (VNO), virus de la encefalitis de San Luis (VESL), virus de la encefalitis del valle de Murray y virus Kunjin), ácidos nucleicos bacterianos (por ejemplo, *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Plasmodium falciparum*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*), micobacterias, ácidos nucleicos fúngicos o ácidos nucleicos de animales o plantas. Los ácidos nucleicos diana pueden ser ácidos nucleicos de animales (por ejemplo, humanos) o se pueden derivar de una muestra animal (por ejemplo, humana) (es decir, pueden estar presentes ácidos nucleicos de organismos víricos u otros patógenos en una muestra de una biopsia animal, muestra de sangre, muestra de orina, muestra fecal, saliva, etc.). Los ácidos nucleicos diana pueden ser, por ejemplo, regiones genéticas humanas que pueden incluir variantes asociadas con la enfermedad (por ejemplo, cáncer, diabetes, etc.). Debido a que las polimerasas de la invención pueden tener tolerancia al emparejamiento erróneo, dichas enzimas pueden ser particularmente útiles, por ejemplo, donde una diversidad de secuencias relacionadas puede estar en una secuencia diana. Como ejemplo, se puede usar la invención para detectar patógenos víricos, donde los patógenos víricos tienen suficiente variación en sus genomas para hacer difícil o imposible diseñar un conjunto único o pequeño de cebadores que amplifiquen la mayoría o todos los genomas víricos posibles o en marcadores genéticos de cáncer o de otras enfermedades en los que se sabe o es probable que se produzca una variación en la secuencia.

Otros procedimientos para detectar productos de extensión o productos de amplificación que usan las polimerasas mejoradas descritas en el presente documento incluyen el uso de tintes de unión a nucleótidos bicatenarios fluorescentes o tintes intercalantes de nucleótidos bicatenarios fluorescentes. Los ejemplos de tintes de unión a ADN bicatenario fluorescentes incluyen SYBR-green (Molecular Probes). Los tintes de unión a ADN bicatenario se pueden usar junto con el análisis de curvas de fusión para medir productos de extensión del cebador y/o productos de amplificación. El análisis de curvas de fusión se puede realizar en un instrumento de PCR en tiempo real, tal como el instrumento ABI 5700/7000 (formato de 96 pocillos) o ABI 7900 (formato de 384 pocillos) con programa informático integrado (SDS 2.1). De forma alternativa, el análisis de curvas de fusión se puede realizar como un análisis de punto final. Los procedimientos ejemplares de análisis de puntos de fusión se describen en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2006/0172324.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan kits para su uso en procedimientos de extensión del cebador descritos en el presente documento. En el presente documento, el kit se puede compartimentar para facilitar su uso y contiene al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa mejorada de acuerdo con la presente invención. También se pueden incluir uno o más recipientes adicionales que proporcionan un reactivo o reactivos adicionales. El kit también puede incluir un tubo de extracción sanguínea, recipiente o unidad que comprenda heparina o una sal de la misma, o libera heparina en solución. La unidad de extracción sanguínea puede ser un tubo heparinizado. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualquier reactivo u otros elementos reconocidos por el experto en la técnica para su uso en procedimientos de extensión del cebador de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, incluyendo reactivos para su uso, por ejemplo, en procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de marcado de ADN. Por ejemplo, el kit puede incluir además un recipiente que proporciona un cebador en sentido 5' hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado, o un par de cebadores que comprende el cebador en sentido 5' y un cebador antisentido en 3' correspondiente. El kit puede incluir uno o más recipientes que proporcionan nucleósidos trifosfato (convencionales y/o no convencionales). Más específicamente, el kit puede incluir dNTP de alfa-fosforotioato, dUTP, dITP, y/o dNTP marcados, tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de los tintes de fluoresceína y cianina. El kit también puede incluir uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión del cebador.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan mezclas de reacción que comprenden las polimerasas con eficacia de transcriptasa inversa, tolerancia al emparejamiento erróneo, velocidad de extensión y/o tolerancia de los inhibidores de la polimerasa y RT incrementadas como se describe en el presente documento. Las mezclas de reacción pueden comprender además reactivos para su uso, por ejemplo, en procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de marcado de ADN. Por ejemplo, en determinados modos de realización, las mezclas de reacción pueden comprender un tampón adecuado para una reacción de extensión del cebador. Las mezclas de reacción también pueden contener un ácido nucleico molde (ADN y/o ARN), uno o más polinucleótidos de sonda o cebadores, nucleósidos trifosfato (incluyendo, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos marcados, nucleótidos no convencionales), sales (por ejemplo, Mn^{2+} , Mg^{2+}), marcadores (por ejemplo, fluoróforos). Las mezclas de reacción pueden contener un cebador en sentido 5' hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado, o un par de cebadores que comprende el cebador en sentido 5' y un cebador antisentido en 3' correspondiente. Las mezclas de reacción pueden contener dNTP de alfa-fosforotioato, dUTP, dITP, y/o dNTP marcados, tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de los tintes de fluoresceína y cianina Las

mezclas de reacción pueden comprender un quelante de hierro o un tinte púrpura. Las mezclas de reacción pueden comprender hemoglobina o un producto de degradación de hemoglobina. Por ejemplo, los productos de degradación de hemoglobina pueden incluir productos de descomposición de hemo, tales como hemina, hematina, hematoporfirina y bilirrubina. Las mezclas de reacción pueden comprender heparina o una sal de la misma. La mezcla de reacción puede contener un ácido nucleico molde que está aislado de la sangre. El ácido nucleico molde puede ser ARN y la mezcla de reacción puede comprender heparina o una sal de la misma.

La mezcla de reacción puede comprender dos o más polimerasas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede comprender una primera ADN polimerasa que tenga eficacia de transcriptasa inversa incrementada en comparación con una polimerasa de control y una segunda ADN polimerasa que tenga actividad de polimerasa dependiente de ADN. La segunda ADN polimerasa puede ser una polimerasa natural o no modificada, o puede ser una polimerasa mejorada que tenga actividad de polimerasa dependiente de ADN incrementada. Dichas mezclas de reacción son útiles para la amplificación de moldes de ARN (por ejemplo, RT-PCR) proporcionando tanto una polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa incrementada como un polímero que tiene actividad de polimerasa dependiente de ADN.

Ejemplos

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Generación de genoteca

En resumen, las etapas en este procedimiento de cribado incluyen la generación de genotecas, expresión y purificación parcial de las enzimas mutantes, cribado de las enzimas frente a las propiedades deseadas, secuenciación de ADN, purificación de clones y caracterización adicional de mutantes candidatos seleccionados. Cada una de estas etapas se describe en detalle a continuación.

Generación de genotecas de clones: Un ácido nucleico que codificaba el dominio de polimerasa de la ADN polimerasa Z05 D580G_I709K se sometió a PCR propensa a errores (mutagénica) entre los sitios de restricción Bsp I y Bgl II de un plásmido que incluía esta secuencia de ácido nucleico. Los cebadores usados para esto se dan a continuación:

Cebador directo: 5'-CTACCTCCTGGACCCCTCCAA-3' (SEQ ID NO: 30); y,

Cebador inverso: 5'-ATAACCAACTGGTAGTGGCGTGTA-3' (SEQ ID NO: 31)

Se realizó la PCR usando una concentración de Mg^{2+} de 1,8 mM para generar una genoteca con una velocidad de mutación deseada. Las condiciones del tampón fueron bicina 50 mM pH 8,2, KOAc 115 mM, glicerol al 8 % p/v y 0,2 mM para cada dNTP. Se utilizó una enzima de PCR de inicio en caliente GeneAmp® AccuRT a 0,15 U/μl. Comenzando con 5×10^5 copias de ADN plasmídico de Z05 D580G_I709K linealizado por volumen de reacción de 50 μl, se desnaturalizaron las reacciones usando una temperatura de 94 °C durante 60 segundos; a continuación, se realizaron 30 ciclos de amplificación, usando una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 15 segundos, una temperatura de hibridación de 60 °C durante 15 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C durante 120 segundos y seguido de una extensión final a una temperatura de 72 °C durante 5 minutos.

El amplicón resultante se purificó con un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EE. UU.) y se cortó con Bsp I y Bgl II, y, a continuación, se repurificó con un kit de purificación de PCR QIAquick. Se preparó un plásmido de vector Z05 D580G_I709K cortando con las mismas dos enzimas de restricción y tratando con fosfatasa alcalina, recombinante (RAS, n.º cat. 03359123001) y se purificó con un kit de purificación de PCR QIAquick. El vector de corte y el inserto mutado se mezclaron en una proporción de 1:3 y se trataron con ADN ligasa T4 durante 5 minutos a temperatura ambiente (Kit NEB Quick Ligation™). Los ligados se purificaron con un kit de purificación de PCR QIAquick y se transformaron en una cepa huésped de *E. coli* mediante electroporación.

Se sembraron en placas alicuotas de los cultivos expresados en medio selectivo de ampicilina para determinar el número de transformantes únicos en cada transformación. Las transformaciones se agruparon y conservaron a -70 °C hasta -80 °C en presencia de glicerol como crioprotector.

A continuación, la genoteca se extendió en placas de agar selectivas a ampicilina de gran formato. Las colonias individuales se transfirieron a placas de 384 pocillos que contenían 2X de caldo Luria con ampicilina y glicerol al 10 % p/v usando un colector automático de colonias (QPix2, Genetix Ltd). Estas placas se incubaron durante la noche a 30 °C para permitir que los cultivos crecieran y, a continuación, se conservaron a -70 °C a -80 °C. El glicerol añadido al 2X de caldo Luria era lo suficientemente bajo para permitir el crecimiento del cultivo y aún lo suficientemente alto para proporcionar crioprotección. Se prepararon varios miles de colonias de esta manera para su uso posterior.

Preparación de genotecas de extractos, parte 1 - fermentación: A partir de las genotecas de clones descritas

anteriormente, se preparó una genoteca correspondiente de extractos parcialmente purificados adecuados para propósitos de cribado. La primera etapa de este procedimiento fue preparar cultivos de expresión a pequeña escala de cada clon. Estos cultivos se cultivaron en un formato de 96 pocillos; por lo tanto, había 4 placas de cultivo de expresión para cada placa de la genoteca de 384 pocillos. Se transfirieron 0,5 µl de cada pocillo de la placa de la genoteca de clones a un pocillo de una placa de siembra de 96 pocillos que contenía 150 µl de medio A (véase la tabla 3 a continuación). Esta placa de siembra se agitó durante la noche a 1150 rpm a 30 °C, en un agitador/incubador de placas iEMS (ThermoElectron). A continuación, estos cultivos de siembra se usaron para inocular el mismo medio, esta vez inoculando 20 µl en 250 µl de medio A en placas de 96 pocillos de gran formato (Nunc n.º 267334). Estas placas se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación. El plásmido de expresión contenía elementos de control transcripcionales, que permiten la expresión a 37 °C, pero no a 30 °C. Después de la incubación durante la noche, los cultivos expresaron la proteína del clon en típicamente un 1-10 % de la proteína celular total. Las células de estos cultivos se recogieron mediante centrifugación. Estas células se congelaron (-20 °C) o bien se procesaron inmediatamente, como se describe a continuación.

Tabla 2. Medio A (esterilizado por filtración antes de su uso)

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

Preparación de la genoteca de extractos, parte 2 - extracción: Los sedimentos celulares de la etapa de fermentación se resuspendieron en 25 µl de tampón de lisis (tabla 3 a continuación) y se transfirieron a placas de termociclador de 384 pocillos y se sellaron. Obsérvese que el tampón contenía lisozima para ayudar en la lisis celular y DNasa para retirar el ADN del extracto. Para lisar las células, las placas se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, se congelaron durante la noche a -20 °C y se incubaron de nuevo a 37 °C durante 15 minutos. Se añadió sulfato de amonio (1,5 µl de una solución 2 M) y las placas se incubaron a 75 °C durante 15 minutos para precipitar e inactivar proteínas contaminantes, incluyendo las nucleasas añadidas de manera exógena. Las placas se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de termociclador de 384 pocillos nueva. Estas placas de extracto se congelaron a -20 °C para su uso posterior en cribados. Cada pocillo contenía aproximadamente 0,5-3 µM de la enzima polimerasa de la genoteca de mutantes.

Tabla 3. Tampón de lisis

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

Ejemplo 2: Identificación de ADN polimerasas mutantes con eficacia de transcripción inversa mejorada

Cribado de genotecas de extractos de proteína en bruto para una eficacia de transcripción inversa mejorada:

La genoteca de extractos se cribó comparando los valores de P_c (punto de corte) de las curvas de crecimiento generadas mediante la actividad de 5'-nucleasa fluorescente (TaqMan) de extractos enzimáticos en bruto en un sistema de RT-PCR a partir de la amplificación de un amplicón de 240 pares de bases del transcrito JP2-5 del virus de la hepatitis C (VHC), que contenía las primeras 800 bases de la 5'NTR del genotipo 1b del VHC en pSP64 poli(A) (Promega).

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador cinético LC 480 de Roche en formato de 384 pocillos, conteniendo cada pocillo 3 µl de un extracto enzimático único diluido 10 veces con tampón que contenía Tris-HCl

20 mM, pH 8, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y Tween-20 al 0,1 % añadido a 12 µl de mezcla maestra de RT-PCR descrita en la tabla 4. Las condiciones de termociclado fueron: 2 minutos a 50 °C (etapa de "UNG"); 2 minutos a 65 °C (etapa de "RT"); 5 ciclos de 94 °C durante 15 segundos seguido de 62 °C durante 30 segundos; y 45 ciclos de 91 °C durante 15 segundos seguido de 62 °C durante 30 segundos.

5

Tabla 4

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Tricina pH 8,3	50 mM
KOAc	60 mM
Glicerol	5 % (v/v)
DMSO	2 % (v/v)
Cebador 1	200 nM
Cebador 2	200 nM
Sonda TaqMan	100 nM
Aptámero	200 nM
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
UNG	2 unidades/µl
ARN diana	6666 copias/µl
Mg(OAc) ₂	2 mM

Se cribaron aproximadamente 5000 clones usando el protocolo anterior. Se seleccionaron 40 clones del grupo original para cribar de nuevo basándose en los valores de punto de corte (Pc) más tempranos y valores de meseta fluorescente por encima de un corte arbitrario calculado mediante el procedimiento de cuantificación absoluta/máximo de la 2.^a derivada. Los pocillos de cultivo correspondientes a los extractos superiores se muestrearon en medio de cultivo reciente y se cultivaron nuevamente para producir nuevas placas de cultivo que contenían los mejores mutantes, así como una serie de cultivos con Z05 D580G_I709K precursora que se usarían para controles comparativos. A continuación, se usaron estas placas de cultivo para preparar nuevos extractos en bruto que se cribaron de nuevo con la misma diana de ARN y condiciones como se describe previamente para el cribado original. La tabla 5 muestra los valores de Pc promedio obtenidos a partir del incremento de señales fluorescentes debido a la hidrólisis en 5' de una sonda marcada con FAM. Los resultados muestran que el clon 0692-F5 amplifica la diana de ARN con una eficacia más alta que la de la Z05 D580G_I709K precursora.

10

15

20

Tabla 5

<u>Clon</u>	<u>Pc promedio</u>
0692-F5	19,7
Z05 D580G_I709K	28,0

La secuencia de ADN de la región mutada del gen de la polimerasa se secuenció para determinar las mutaciones que estaban presentes en cualquier clon individual. El clon 0692-F5 se eligió para pruebas adicionales, de modo que la proteína polimerasa mutante se expresó en cultivo en matraz, se purificó hasta la homogeneidad y se cuantificó.

25

Uso del mutante 0692-F5 totalmente purificado en la RT-PCR basada en Mg²⁺: El mutante 0692-F5 purificado y cuantificado se comparó con la Z05 D580G_I709K precursora por RT-PCR basada en Mg²⁺ TaqMan. Las eficacias de transcripción inversa y PCR se midieron comparando los valores de Pc de las amplificaciones del transcrito de ARN JP2-5 y del plásmido lineal de ADN pJP2-5 digeridos con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Los oligonucleótidos y las condiciones de mezcla maestra (tabla 4) fueron los mismos que se usaron en el cribado original. Cada reacción tenía 100 000 copias de ARN de transcrito JP2-5, 100 000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5 o 1000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5. Todas las dianas se amplificaron con el cebador 1 y el cebador 2, como se describe anteriormente, en reacciones duplicadas para generar un amplicón de 240 pares de bases. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Roche Light Cycler 480 con un volumen de reacción de 15 µl. Los puntos de corte (Pc) se calcularon mediante el procedimiento de cuantificación absoluta/máximo de la 2.^a derivada y se promediaron. Las condiciones de la mezcla maestra fueron las mismas que las descritas anteriormente en la tabla 4, excepto que las reacciones se llevaron a cabo utilizando un intervalo de

30

35

concentraciones de ADN polimerasa de 5 nM-40 nM. Las condiciones de termociclado fueron: 2 minutos a 50 °C (etapa de "UNG"); 2 minutos a 65 °C (etapa de "RT"); 5 ciclos de 94 °C durante 15 segundos seguido de 62 °C durante 30 segundos; y 45 ciclos de 91 °C durante 15 segundos seguido de 62 °C durante 30 segundos. La tabla 6 muestra los valores de Pc obtenidos a partir del incremento de señales fluorescentes debido a la escisión de la sonda TaqMan en condiciones de enzima 20 nM.

Tabla 6

Enzima	Pc de 10 ⁵ copias de ARN	Pc de 10 ⁵ copias de ADN	Pc de 10 ³ copias de ADN
Z05 D580G_I709K	28,8	17,5	24,4
0692-F5	19,2	16,9	24,1

Los resultados indican que la ADN polimerasa mutante 0692-F5 permite una amplificación más eficaz de la diana de ARN sin comprometer la eficacia de la PCR en una diana de ADN, en comparación con la Z05 D580G_I709K precursora.

Determinación de mutaciones que confieren fenotipo: Los resultados de la secuenciación revelaron que la polimerasa expresada por el clon 0692-F5 portaba las mutaciones W430C, Y698F y A707G, además de las mutaciones D580G e I709K de la precursora. La mutación Y698F también se encontró en otro clon que mostró una mejoría en la amplificación de ARN respecto a la Z05 D580G_I709K precursora en el cribado por RT-PCR. Sobre la base de este aislamiento independiente adicional de la misma mutación cambiante de aminoácidos en otro clon, los autores predijeron que la mutación Y698F es responsable del fenotipo favorable observado. Se construyó una Z05 D580G_I709K_Y698F mutante por subclonación; se purificó, se cuantificó y se comparó con 0692-F5 (Z05 D580G_I709K_W430C_Y698F_A707G) y Z05 D580G_I709K precursora en una RT-PCR con TaqMan activada por Mg²⁺ con diferentes concentraciones de KOAc de 40 mM-110 mM y enzima purificada 25 nM. Las condiciones de la mezcla maestra fueron las mismas que las descritas anteriormente en la tabla 4. Cada reacción tenía 100 000 copias de transcrito de ARN de JP2-5, 100 000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5 o 1000 copias de ADN plasmídico lineal de pJP2-5. Se amplificaron todas las dianas con el mismo conjunto de cebadores en reacciones por duplicado para generar un amplicón de 240 pares de bases. Las eficiencias de la PCR y la RT-PCR se determinaron comparando los valores de los Pc entre el ADN y el ARN. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Roche Light Cycler 480 con un volumen de reacción de 15 µl. Los puntos de corte (Pc) se calcularon mediante el procedimiento de cuantificación absoluta/máximo de la 2.^a derivada y los Pc se promediaron. Las condiciones de termociclado fueron: 2 minutos a 50 °C (etapa de "UNG"); 2 minutos a 65 °C (etapa de "RT"); 5 ciclos de 94 °C durante 15 segundos seguido de 62 °C durante 30 segundos; y 45 ciclos de 91 °C durante 15 segundos seguido de 62 °C durante 30 segundos. La tabla 8 muestra los valores de Pc obtenidos a partir del incremento de señales fluorescentes debido a la escisión de la sonda TaqMan en condiciones de KOAc 60 nM.

Tabla 8

Enzima	Pc de 10 ⁵ copias de ARN	Pc de 10 ⁵ copias de ADN	Pc de 10 ³ copias de ADN
Z05 D580G_I709K	28,1	17,2	24,1
0692-F5	19,1	17,1	24,2
Z05 D580G_I709K_Y698F	18,9	17,1	24,1

0692-F5 (Z05 D580G_I709K_Y698F_A707G) y Z05 D580G_I709K_Y698F tienen valores de Pc similares en los ARN y ADN diana, lo que demuestra que la mutación Y698F confiere la mejora observada en el rendimiento de la RT-PCR.

Se entiende que los ejemplos y modos de realización descritos en el presente documento son únicamente para propósitos ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a expertos en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> ADN polimerasas con actividad mejorada
- <130> 27285 WO-HS
- 10 <140> No asignado todavía
<141> No asignado todavía
- <150> US 61/568.457
<151> 08/12/2011
- 15 <160> 39
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 834
<212> PRT
<213> *Thermus* sp.
- 25 <220>
<223> ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05)

<400> 1

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

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

 Met Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val
 755 760 765
 Lys Leu Phe Pro His Leu Arg Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln
 770 775 780
 Val His Asp Glu Leu Leu Leu Glu Ala Pro Gln Ala Arg Ala Glu Glu
 785 790 795 800
 Val Ala Ala Leu Ala Lys Glu Ala Met Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Ala
 805 810 815
 Val Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala
 820 825 830
 Lys Gly

<210> 2
 <211> 832
 <212> PRT
 5 <213> *Thermus aquaticus*

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)

10 <400> 2
 Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 25 30
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50 55 60
 Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65 70 75 80
 Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 85 90 95
 Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 105 110
 Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125
 Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140
 Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430

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

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

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

<400> 3
 Met Leu Pro Leu Leu Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val Asp Gly
 1 5 10 15
 His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu Thr Thr
 20 25 30
 Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys Ser Leu

Leu	Lys	35	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	40	Gly	Glu	Val	Ala	Ile	45	Val	Val	Phe	Asp
Ala	Lys	50	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	55	His	Glu	Ala	Tyr	60	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ala
65	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	70	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	75	Gln	Leu	Ala	Leu	80
Lys	Glu	Leu	Val	Asp	85	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Arg	Leu	Glu	Val	Pro	Gly	95	Ile
Phe	Glu	Ala	Asp	Asp	100	Val	Leu	Ala	Thr	105	Leu	Ala	Arg	Lys	110	Ala	Glu	Arg
Glu	Gly	115	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	120	Leu	Ser	Ala	Asp	125	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gln
130	Leu	Ser	Asp	Arg	Ile	135	His	Leu	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Glu	Val	Leu	160	Trp
145	Thr	Pro	Gly	Trp	150	Gln	Glu	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Glu	Arg	175	Trp	Trp
Val	Glu	Tyr	Arg	165	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	170	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Gly	Gly
Val	Pro	Gly	Ile	180	Gly	Glu	Lys	Thr	185	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Trp	Trp
Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Lys	Pro	Glu	205	Trp	Trp
Arg	210	Val	Trp	Glu	Ala	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Gln	Met	Ser	240	Ser
225	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Phe	255	Phe
Ala	Lys	Arg	Arg	245	Glu	Pro	Thr	Gly	Lys	250	Gly	Leu	Lys	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu
Arg	Leu	Glu	Phe	260	Gly	Ser	Leu	Leu	His	265	Gly	Leu	Lys	Ala	270	Leu	Glu	Ala
Pro	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Phe	285	Ala	Phe
Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser	310	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp	Ala	Glu	Leu	Leu	320	Leu
Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Lys	Glu	Gly	Arg	Val	His	Arg	Ala	Glu	Asp	Pro	335	Pro	Pro
Val	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Arg	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	350	Lys	Lys
Asp	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Glu	Gly	Arg	Glu	Ile	Pro	Pro	Gly	365	Pro	Gly
Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Gly	Asn	Thr	Asn	380	Thr	Asn
Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp	Lys	Glu	Asp	Ala	400	Ala	Ala
Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	Trp	Gln	Ala	Leu	Tyr	Pro	415	Pro	Pro	Pro
Arg	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	Arg	Glu	Val	Glu	430	Glu	Glu
Arg	Pro	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala	Thr	Gly	Val	Arg	445	Val	Arg
Leu	Asp	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Glu	Val	Ala	Phe	Glu	460	Phe	Glu
Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Val	His	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Pro	Phe	480	Pro	Phe
Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Asp	Glu	Leu	495	Leu	Leu
Gly	Leu	Pro	Pro	Ile	Gly	Lys	Thr	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser	Thr	510	Thr	Thr
Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Val	Gly	525	Gly	Gly
Arg	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile	540	Ile	Ile
Asp	Pro	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	His	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Leu	His	Thr	560	Thr	Thr
545	Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Asp	575	Asp	Asp
				565						570								

Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile
 580 585 590
 Arg Lys Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly His Leu Leu Val Ala Leu Asp
 595 600 605
 Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu
 610 615 620
 Asn Leu Ile Arg Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Ile His Thr Glu Thr
 625 630 635 640
 Ala Ala Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Gly Val Asp Gly Ala Met
 645 650 655
 Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser
 660 665 670
 Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala
 675 680 685
 Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp
 690 695 700
 Ile Ala Lys Thr Leu Glu Gly Arg Lys Lys Gly Tyr Val Glu Thr
 705 710 715 720
 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Asn Ala Arg Val Lys
 725 730 735
 Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln
 740 745 750
 Gly Thr Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro
 755 760 765
 Arg Leu Arg Pro Leu Gly Val Arg Ile Leu Leu Gln Val His Asp Glu
 770 775 780
 Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Ala Arg Ala Glu Glu Ala Ala Gln Leu
 785 790 795 800
 Ala Lys Glu Thr Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ser Val Pro Leu Glu
 805 810 815
 Val Glu Val Gly Met Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

<210> 4
 <211> 831
 <212> PRT
 <213> *Thermus flavus*

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

<400> 4
 Met Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu
 20 25 30
 Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys
 35 40 45
 Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Val Val Val Val
 50 55 60
 Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr
 65 70 75 80
 Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala
 85 90 95
 Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val
 100 105 110
 Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Arg Ala
 115 120 125
 Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp Leu
 130 135 140
 Tyr Gln Leu Leu Ser Glu Arg Ile Ala Ile Leu His Pro Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro Glu
 165 170 175
 Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile
 180 185 190
 Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Gln Arg Leu Ile Arg

		195					200					205			
Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	His	Leu	Asp	Gln	Val	Lys
Pro	Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln	Ala	Gly	Met	Glu	Ala	Leu	Ala	Leu
225	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Gln	Val	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Glu	Val
			245	Arg	Thr	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	255	Asp
Phe	Gly	Arg	Arg	260	Thr	Pro	Asn	Leu	265	Gly	Leu	Arg	Ala	270	Phe
Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Glu
		275					280					285			
Gly	Pro	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro	Glu	Gly	Ala
						295					300				
Phe	Leu	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp	Ala	Glu	Leu
305	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Glu	Gly	Arg	Leu	His	Arg	Ala	Gln	Asp
				325					330					335	
Pro	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys	Gly	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	Ala
			340					345					350		
Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Arg	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Phe	Pro
		355					360					365			
Glu	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Asn	Thr
		370				375					380				
Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp	Thr	Glu	Asp
385					390					395					
Ala	Gly	Glu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Phe	Gln	Thr	Leu	Lys
				405					410					415	
Glu	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	Glu	Glu	Val
			420					425					430		
Glu	Lys	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Ala	Thr	Gly	Val
		435					440					445			
Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Glu	Val	Glu	Ala
		450				455					460				
Glu	Val	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Pro
465					470				475						480
Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Asp	Glu
				485					490					495	
Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Ile	Gly	Lys	Thr	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ser
			500					505					510		
Thr	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Val
		515					520					525			
Asp	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Arg	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Thr	Tyr
		530				535					540				
Ile	Asp	Pro	Leu	Pro	Ala	Leu	Val	His	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Leu	His
545					550					555					560
Thr	Arg	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser
				565					570					575	
Asp	Pro	Asn	Leu												

Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val
 Gln Gly Thr 740 Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Arg Leu Phe
 Pro Arg 755 Gln Glu Leu Gly 760 Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp
 Glu 770 Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala
 785 Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu
 Glu Val Glu Val 805 Leu Gly Glu Asp 810 Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

<210> 5
 <211> 830
 <212> PRT
 <213> *Thermus* sp.

<220>
 <223> ADN polimerasa sps17 de *Thermus* sp. (sps17)
 <400> 5

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

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

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

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

<400> 6

Met	Glu	Ala	Met	Leu	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gly	Arg	Val	Leu	Leu
1				5				10						15	
Val	Asp	Gly	His	His	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Leu	Lys	Gly
			20					25					30		
Leu	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Ala
			35				40					45			
Lys	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe
	50					55					60				
Val	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	His	Glu	Ala	Tyr	Glu
65					70					75					80
Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln
				85					90					95	
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Leu
			100					105					110		
Glu	Val	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys
		115					120					125			
Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg
	130					135					140				
Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
145					150					155					160
Gly	His	Leu	Ile	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Arg
				165					170					175	
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
			180					185					190		
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu
		195					200					205			
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg
	210					215					220				
Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
225					230					235					240
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu
				245					250					255	
Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
			260					265					270		
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
		275					280					285			
Leu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Trp	Pro	Pro	Pro
		290				295					300				
Glu	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Met	Trp
305					310					315					320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg	Asp	Gly	Arg	Val	His	Arg
				325					330					335	
Ala	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Gly
			340					345					350		
Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu	Gly	Leu	Asp
		355					360					365			
Leu	Val	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asp	Pro
		370				375					380				
Ser	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp
385					390					395					400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	His	Arg
				405					410					415	
Asn	Leu	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu	Lys	Leu	Leu	Trp	Leu	Tyr	
			420					425				430			
His	Glu	Val	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Ala	His	Met	Glu	Ala
		435					440					445			
Thr	Gly	Val	Arg	Arg	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Glu
		450				455					460				
Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Leu	Ala
465					470					475					480
Gly	His	Pro	Phe	Asn	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Leu
				485					490					495	
Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly
			500					505					510		

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

<210> 7
 <211> 834
 <212> PRT
 <213> *Thermus caldophilus*

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tca)

<400> 7
 Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
 20 25 30
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
 50 55 60
 Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
 65 70 75 80
 Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
 85 90 95
 Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu

			100					105					110		
Glu	Val	Pro 115	Gly	Tyr	Glu	Ala	Asp 120	Asp	Val	Leu	Ala	Thr 125	Leu	Ala	Lys
Asn	Pro 130	Glu	Lys	Glu	Gly	Tyr 135	Glu	Val	Arg	Ile	Leu 140	Thr	Ala	Asp	Arg
Asp 145	Leu	Asp	Gln	Leu	Val 150	Ser	Asp	Arg	Val	Ala 155	Val	Leu	His	Pro	Glu 160
Gly	His	Leu	Ile	Thr 165	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp 170	Gln	Lys	Tyr	Gly	Leu 175	Lys
Pro	Glu	Gln	Trp 180	Val	Asp	Phe	Arg	Ala 185	Leu	Val	Gly	Asp	Pro 190	Ser	Asp
Asn	Leu	Pro 195	Gly	Val	Lys	Gly	Ile 200	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala 205	Leu	Lys	Leu
Leu	Lys 210	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu 215	Glu	Asn	Leu	Leu	Lys 220	Asn	Leu	Asp	Arg
Val 225	Lys	Pro	Glu	Asn	Val 230	Arg	Glu	Lys	Ile	Lys 235	Ala	His	Leu	Glu	Asp 240
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu 245	Glu	Leu	Ser	Arg	Val 250	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro 255	Leu
Glu	Val	Asp	Leu 260	Ala	Gln	Gly	Arg	Glu 265	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly 270	Leu	Arg
Ala	Phe	Leu 275	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe 280	Gly	Ser	Leu	Leu	His 285	Glu	Phe	Gly
Leu	Leu 290	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro 295	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro 300	Trp	Pro	Pro	Pro
Glu 305	Gly	Ala	Phe	Val	Gly 310	Phe	Val	Leu	Ser	Arg 315	Pro	Glu	Pro	Met	Trp 320
Ala	Glu	Leu	Lys	Ala 325	Leu	Ala	Ala	Cys	Arg 330	Asp	Gly	Arg	Val	His 335	Arg
Ala	Ala	Asp	Pro 340	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys 345	Asp	Leu	Lys	Glu	Val 350	Arg	Gly
Leu	Leu	Ala 355	Lys	Asp	Leu	Ala	Val 360	Leu	Ala	Ser	Arg	Glu 365	Gly	Leu	Asp
Leu	Val 370	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro 375	Met	Leu	Leu	Ala	Tyr 380	Leu	Leu	Asp	Pro
Ser 385	Asn	Thr	Thr	Pro	Glu 390	Gly	Val	Ala	Arg	Arg 395	Tyr	Gly	Gly	Glu	Trp 400
Thr	Glu	Asp	Ala	Ala 405	His	Arg	Ala	Leu	Leu 410	Ser	Glu	Arg	Leu	His 415	Arg
Asn	Leu	Leu	Lys 420	Arg	Leu	Gln	Gly	Glu 425	Glu	Lys	Leu	Leu	Trp 430	Leu	Tyr
His	Glu	Val 435	Glu	Lys	Pro	Leu	Ser 440	Arg	Val	Leu	Ala	His 445	Met	Glu	Ala
Thr	Gly 450	Val	Arg	Leu	Asp	Val 455	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala 460	Leu	Ser	Leu	Glu
Leu 465	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg 470	Arg	Leu	Glu	Glu	Glu 475	Val	Phe	Arg	Leu	Ala 480
Gly	His	Pro	Phe	Asn 485	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp 490	Gln	Leu	Glu	Arg	Val 495	Leu
Phe	Asp	Glu	Leu 500	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu 505	Gly	Lys	Thr	Gln	Lys 510	Thr	Gly
Lys	Arg	Ser 515	Thr	Ser	Ala	Ala	Val 520	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg 525	Glu	Ala	His
Pro	Ile 530	Val	Glu	Lys	Ile	Leu 535	Gln	His	Arg	Glu	Leu 540	Thr	Lys	Leu	Lys
Asn 545	Thr	Tyr	Val	Asp	Pro 550	Leu	Pro	Ser	Leu	Val 555	His	Pro	Asn	Thr	Gly 560
Arg	Leu	His	Thr	Arg 565	Phe	Asn	Gln	Thr	Ala 570	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg 575	Leu
Ser	Ser	Ser	Asp 580	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn 585	Ile	Pro	Val	Arg	Thr 590	Pro	Leu
Gly	Gln	Arg 595	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe 600	Val	Ala	Glu	Ala	Gly 605	Trp	Ala	Leu
Val	Ala 610	Leu	Asp	Tyr	Ser	Gln 615	Ile	Glu	Leu	Arg	Val 620	Leu	Ala	His	Leu
Ser	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ile	Arg	Val	Phe	Gln	Glu	Gly	Lys	Asp	Ile

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

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo de ADN polimerasa sintética

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Ala o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Val, Gln, Ala, Glu o Lys

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Ala, Lys, Thr o Glu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Phe, Met o Ile

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Glu, Val, Ile o Asp

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

<220>

- <221> VARIANTE
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Tyr
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)...(11)
<223> Xaa = Gln, Val, Thr, Arg, Ala o Glu
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)...(12)
<223> Xaa = Ser, Leu, Tyr o Thr
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)...(13)
<223> Xaa = Phe o Tyr
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)...(14)
<223> Xaa = Pro o Lys
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (15)...(15)
<223> Xaa = Lys o Gly
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = Val o Ile
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (17)...(17)
<223> Xaa = Arg, Phe o Lys
- 40 <400> 8
Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa
- <210> 9
<211> 17
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> motivo de ADN polimerasa sintética
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = Val, Gln, Ala o Glu
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Ala o Lys
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Phe o Met

	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(7)...(7)
5	<223>	Xaa = Glu, Val o Ile
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(8)...(8)
10	<223>	Xaa = Arg, Asn o Ser
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(9)...(9)
15	<223>	Xaa = cualquier aminoácido distinto de Tyr
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(11)...(11)
20	<223>	Xaa = Gln, Val o Thr
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(12)...(12)
25	<223>	Xaa = Ser o Leu
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(13)...(13)
30	<223>	Xaa = Phe o Tyr
	<400>	9
	Glu Ala Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Pro Lys Val 1 5 10 15 Arg	
35	<210>	10
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
40	<220>	
	<223>	motivo de ADN polimerasa sintética
	<220>	
	<221>	VARIANTE
45	<222>	(3)...(3)
	<223>	Xaa = Val, Gln o Ala
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(9)...(9)
50	<223>	Xaa = cualquier aminoácido distinto de Tyr
	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(13)...(13)
55	<223>	Xaa = Phe o Tyr
	<400>	10
	Glu Ala Xaa Ala Phe Ile Glu Arg Xaa Phe Gln Ser Xaa Pro Lys Val 1 5 10 15 Arg	
60	<210>	11
	<211>	17

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)...(3)
10 <223> Xaa = Val, Gln o Ala

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)...(13)
15 <223> Xaa = Phe o Tyr

<400> 11
Glu Ala Xaa Ala Phe Ile Glu Arg Phe Phe Gln Ser Xaa Pro Lys Val
1 5 10 15
Arg

20 <210> 12
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa Z05 de *Thermus* sp. (Z05)
<400> 12
Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile
1 5 10 15
Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys
20 25 30
Thr Leu Glu
35

30 <210> 13
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)
<400> 13
Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Gln Ala Phe Ile
1 5 10 15
Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys
20 25 30
Thr Leu Glu
35

40 <210> 14
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi)
<400> 14

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

<210> 15
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl)

<400> 15
 Leu Ser Gly Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Tyr Pro Lys Val Arg Ala Trp Ile Glu Gly
 20 25 30
 Thr Leu Glu
 35

<210> 16
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa sps17 de *Thermus* sp. (Sps17)

<400> 16
 Leu Ser Gln Glu Leu Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp Ile Ala Lys
 20 25 30
 Thr Leu Glu
 35

<210> 17
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth)

<400> 17
 Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp Ile Glu Lys
 20 25 30
 Thr Leu Glu
 35

<210> 18
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Thermus caldophilus* (Tea)

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 19
 Leu Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Val Lys Glu Ala Glu Lys Met Ile
 1 5 10 15
 Val Asn Tyr Phe Val Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp Tyr Ile Gln Arg
 20 25 30
 Val Val Ser
 35

<210> 20
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 20
 Leu Ser Val Arg Leu Gly Ile Pro Val Lys Glu Ala Glu Lys Met Ile
 1 5 10 15
 Ile Ser Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Lys Val Arg Ser Tyr Ile Gln Gln
 20 25 30
 Val Val Ala
 35

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

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

<400> 21
 Leu Ser Lys Arg Ile Gly Leu Ser Val Ser Glu Thr Lys Lys Ile Ile
 1 5 10 15
 Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr Leu Lys Arg
 20 25 30
 Met Lys Asp
 35

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo A del sitio activo de la ADN polimerasa conservado sintético

<400> 22
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg
 1 5

- <210> 23
<211> 35
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Deinococcus radiodurans* (Dra)
- 10 <400> 23
Leu Ser Asn Asp Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Glu Ala Ala Thr Phe Ile
1 5 10 15
Glu Ile Tyr Phe Ala Thr Tyr Pro Gly Ile Arg Arg Tyr Ile Asn His
20 25 30
Thr Leu Asp
35
- <210> 24
<211> 35
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)
- 20 <400> 24
Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Thr Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe Ile
1 5 10 15
Glu Arg Tyr Phe Ala Ser Phe Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Asp Asn
20 25 30
Ile Val Gln
35
- <210> 25
25 <211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
30 <223> región del dominio de polimerasa sintética de la ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)
- <400> 25
Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Ser Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe Ile
1 5 10 15
Glu Arg Tyr Phe Glu Ser Phe Pro Gly Val Lys Arg Tyr Met Glu Asn
20 25 30
Ile Val Gln
35
- 35 <210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> motivo consenso nativo de la región del dominio de polimerasa sintética
<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)...(2)
- 45 <223> Xaa = Ala o Thr
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)...(3)
- 50 <223> Xaa = Val, Gln, Ala, Glu o Lys

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Ala, Lys, Thr o Glu
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Phe, Met o Ile
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Glu, Val, Ile o Asp
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Arg, Asn, Ser o Ile
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Gln, Val, Thr, Arg, Ala o Glu
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Ser, Leu, Tyr o Thr
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Phe o Tyr
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = Pro o Lys
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Lys o Gly
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)...(16)
 <223> Xaa = Val o Ile
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)...(17)
 <223> Xaa = Arg, Phe o Lys
 55
 <400> 26
 Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 60
 <210> 27
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

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

<400> 27

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

5

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

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

- 5 <210> 28
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> ADN polimerasa CS6 quimérica sintética derivada del dominio 5'-nucleasa N-terminal de *Thermus* sp. Z05 y los dominios polimerasa y exonucleasa 3'-5' C-terminales de las ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*
- <400> 28

Met	Lys	Ala	Met	Leu	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gly	Arg	Val	Leu	Leu
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	His	His	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Leu	Lys	Gly
			20					25					30		
Leu	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Ala
		35					40					45			
Lys	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe
	50					55					60				
Val	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	His	Glu	Ala	Tyr	Glu
65					70					75					80
Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln
				85					90					95	
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Leu
			100					105					110		
Glu	Val	Pro	Gly	Phe	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys
		115					120					125			
Lys	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Arg
	130					135					140				
Asp	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu
145					150					155					160
Gly	His	Leu	Ile	Thr	Pro	Glu	Trp	Leu	Trp	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Lys
			165					170						175	
Pro	Glu	Gln	Trp	Val	Asp	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Asp
		180						185					190		
Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Leu
		195					200					205			
Leu	Lys	Glu	Trp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Arg
	210					215					220				
Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	Arg	Glu	Arg	Ile	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp
225					230					235					240
Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu
				245					250					255	
Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	Pro	Asp	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg
			260					265					270		
Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	His	Glu	Phe	Gly
		275					280					285			
Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Val	Lys	Asp	Leu
	290					295					300				
Val	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Phe
305					310					315					320
Ala	Ile	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Pro	Phe	Asp	Cys	Asp	Ile
			325						330				335		
Val	Gly	Ile	Ser	Val	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Pro
		340						345					350		
Leu	His	His	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Lys
		355					360					365			
Lys	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Val	Gly	Gln
	370					375					380				
Asn	Leu	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Val	Leu	Met	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Pro
385					390					395					400
Val	Pro	Pro	Tyr	Phe	Asp	Thr	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Glu	Pro
			405						410					415	
Asn	Glu	Lys	Lys	Phe	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly
		420						425					430		
Tyr	Lys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Pro	Leu
		435					440					445			
Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Ala	Asn	Tyr
	450					455					460				
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser
465					470					475					480
Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Lys	Ile	Glu
				485					490					495	
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Gly	Val	Tyr
			500					505					510		
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys
		515					520					525			

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

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

- 5 <210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> motivo de ADN polimerasa sintética

 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala, Asp, Ser, Glu, Arg o Gln

 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Trp o Tyr

 <220>

	<221>	VARIANTE
	<222>	(3)...(3)
	<223>	Xaa = cualquier aminoácido distinto de Ile, Leu o Met
5	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(4)...(4)
	<223>	Xaa = Glu, Ala, Gln, Lys, Asn o Asp
10	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(5)...(5)
	<223>	Xaa = Lys, Gly, Arg, Gln, His o Asn
15	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(6)...(6)
	<223>	Xaa = Thr, Val, Met o Ile
20	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(7)...(7)
	<223>	Xaa = Leu, Val o Lys
25	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(8)...(8)
	<223>	Xaa = Glu, Ser, Ala, Asp o Gln
30	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(9)...(9)
	<223>	Xaa = Glu o Phe
35	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(10)...(10)
	<223>	Xaa = Gly o Ala
40	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(11)...(11)
	<223>	Xaa = Arg o Lys
45	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(12)...(12)
	<223>	Xaa = Lys, Arg, Glu, Thr o Gln
50	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(13)...(13)
	<223>	Xaa = Arg, Lys o His
55	<220>	
	<221>	VARIANTE
	<222>	(17)...(17)
	<223>	Xaa = Glu, Arg o Thr
60	<400>	29
	Xaa	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Val
	1	5 10 15
	Xaa	Thr Leu
	<210>	30
	<211>	21

	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
5	<223>	cebador directo sintético de amplificación por PCR propensa a errores (mutagénica)	
	<400>	30	21
		ctacctctg gacccctcca a	
10	<210>	31	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	cebador inverso sintético de amplificación por PCR propensa a errores (mutagénica)	
	<400>	31	25
		ataaccaact ggtagtggcg tgtaa	
20	<210>	32	
	<211>	921	
	<212>	PRT	
	<213>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	
25	<220>		
	<223>	ADN polimerasa de <i>Deinococcus radiodurans</i> (Dra)	
	<400>	32	
		Met Ala Asp Ala Ser Pro Asp Pro Ser Lys Pro Asp Ala Leu Val Leu 1 5 10 15 Ile Asp Gly His Ala Leu Ala Phe Arg Ser Tyr Phe Ala Leu Pro Pro 20 25 30 Leu Asn Asn Ser Lys Gly Glu Met Thr Asp Ala Ile Val Gly Phe Met 35 40 45 Lys Leu Leu Leu Arg Leu Ala Arg Gln Lys Ser Asn Gln Val Ile Val 50 55 60 Val Phe Asp Pro Pro Val Lys Thr Leu Arg His Glu Gln Tyr Glu Gly 65 70 75 80 Tyr Lys Ser Gly Arg Ala Gln Thr Pro Glu Asp Leu Arg Gly Gln Ile 85 90 95 Asn Arg Ile Arg Ala Leu Val Asp Ala Leu Gly Phe Pro Arg Leu Glu 100 105 110 Glu Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Ile Ala Ser Leu Thr Arg Met 115 120 125 Ala Glu Gly Lys Gly Tyr Glu Val Arg Ile Val Thr Ser Asp Arg Asp 130 135 140 Ala Tyr Gln Leu Leu Asp Glu His Val Lys Val Ile Ala Asn Asp Phe 145 150 155 160 Ser Leu Ile Gly Pro Ala Gln Val Glu Glu Lys Tyr Gly Val Thr Val 165 170 175 Arg Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Ala Ser Asp Asn 180 185 190 Ile Pro Gly Ala Lys Gly Ile Gly Pro Lys Thr Ala Ala Lys Leu Leu 195 200 205 Gln Glu Tyr Gly Thr Leu Glu Lys Val Tyr Glu Ala Ala His Ala Gly 210 215 220 Thr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Arg Lys Lys Leu Leu Asp Ser Glu Glu 225 230 235 240 Asn Val Lys Phe Ser His Asp Leu Ser Cys Met Val Thr Asp Leu Pro 245 250 255 Leu Asp Ile Glu Phe Gly Val Arg Arg Leu Pro Asp Asn Pro Leu Val 260 265 270 Thr Glu Asp Leu Leu Thr Glu Leu Glu Leu His Ser Leu Arg Pro Met 275 280 285	

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

Arg Arg Tyr Val Pro Gly Leu Ser Ser Arg Asn Arg Val Gln Arg Glu
 820 825 830
 Ala Glu Glu Arg Leu Ala Tyr Asn Met Pro Ile Gln Gly Thr Ala Ala
 835 840 845
 Asp Ile Met Lys Leu Ala Met Val Gln Leu Asp Pro Gln Leu Asp Ala
 850 855 860
 Ile Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu Leu Leu Ile Glu
 865 870 875 880
 Ala Pro Leu Asp Lys Ala Glu Gln Val Ala Ala Leu Thr Lys Lys Val
 885 890 895
 Met Glu Asn Val Val Gln Leu Lys Val Pro Leu Ala Val Glu Val Gly
 900 905 910
 Thr Gly Pro Asn Trp Phe Asp Thr Lys
 915 920

<210> 33
 <211> 892
 <212> PRT
 <213> *Thermosipho africanus*

<220>
 10 <223> ADN polimerasa de *Thermosipho africanus* (Taf)

<400> 33
 Met Gly Lys Met Phe Leu Phe Asp Gly Thr Gly Leu Val Tyr Arg Ala
 1 5 10 15
 Phe Tyr Ala Ile Asp Gln Ser Leu Gln Thr Ser Ser Gly Leu His Thr
 20 25 30
 Asn Ala Val Tyr Gly Leu Thr Lys Met Leu Ile Lys Phe Leu Lys Glu
 35 40 45
 His Ile Ser Ile Gly Lys Asp Ala Cys Val Phe Val Leu Asp Ser Lys
 50 55 60
 Gly Gly Ser Lys Lys Arg Lys Asp Ile Leu Glu Thr Tyr Lys Ala Asn
 65 70 75 80
 Arg Pro Ser Thr Pro Asp Leu Leu Leu Glu Gln Ile Pro Tyr Val Glu
 85 90 95
 Glu Leu Val Asp Ala Leu Gly Ile Lys Val Leu Lys Ile Glu Gly Phe
 100 105 110
 Glu Ala Asp Ile Ile Ala Thr Leu Ser Lys Lys Phe Glu Ser Asp
 115 120 125
 Phe Glu Lys Val Asn Ile Ile Thr Gly Asp Lys Asp Leu Leu Gln Leu
 130 135 140
 Val Ser Asp Lys Val Phe Val Trp Arg Val Glu Arg Gly Ile Thr Asp
 145 150 155 160
 Leu Val Leu Tyr Asp Arg Asn Lys Val Ile Glu Lys Tyr Gly Ile Tyr
 165 170 175
 Pro Glu Gln Phe Lys Asp Tyr Leu Ser Leu Val Gly Asp Gln Ile Asp
 180 185 190
 Asn Ile Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Lys Lys Thr Ala Val Ser Leu
 195 200 205
 Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Leu Glu Asn Val Leu Lys Asn Ile Asn Leu
 210 215 220
 Leu Thr Glu Lys Leu Arg Arg Leu Leu Glu Asp Ser Lys Glu Asp Leu
 225 230 235 240
 Gln Lys Ser Ile Glu Leu Val Glu Leu Ile Tyr Asp Val Pro Met Asp
 245 250 255
 Val Glu Lys Asp Glu Ile Ile Tyr Arg Gly Tyr Asn Pro Asp Lys Leu
 260 265 270
 Leu Lys Val Leu Lys Lys Tyr Glu Phe Ser Ser Ile Ile Lys Glu Leu
 275 280 285
 Asn Leu Gln Glu Lys Leu Glu Lys Glu Tyr Ile Leu Val Asp Asn Glu
 290 295 300
 Asp Lys Leu Lys Lys Leu Ala Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Lys Thr Phe
 305 310 315 320
 Ser Ile Asp Thr Glu Thr Thr Ser Leu Asp Pro Phe Glu Ala Lys Leu
 325 330 335

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

 Lys Ile Ile Asp Asn Tyr Phe Arg Tyr Tyr Lys Gly Val Phe Glu Tyr
 755 760 765
 Leu Lys Arg Met Lys Asp Glu Ala Arg Lys Lys Gly Tyr Val Thr Thr
 770 775 780
 Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Ile Pro Gln Leu Arg Ser Lys Asn Gly
 785 790 795 800
 Asn Arg Val Gln Glu Gly Glu Arg Ile Ala Val Asn Thr Pro Ile Gln
 805 810 815
 Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ile Ala Met Ile Asn Ile His Asn
 820 825 830
 Arg Leu Lys Lys Glu Asn Leu Arg Ser Lys Met Ile Leu Gln Val His
 835 840 845
 Asp Glu Leu Val Phe Glu Val Pro Asp Asn Glu Leu Glu Ile Val Lys
 850 855 860

Asp Leu Val Arg Asp Glu Met Glu Asn Ala Val Lys Leu Asp Val Pro
 865 870 875 880
 Leu Lys Val Asp Val Tyr Tyr Gly Lys Glu Trp Glu
 885 890

<210> 34
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> *Thermotoga maritima*

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

<400> 34

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

Asn 385 Leu Lys Phe Asp Tyr 390 Lys Val Leu Met Val 395 Lys Gly Val Glu Pro 400
 Val Pro Pro Tyr Phe 405 Asp Thr Met Ile Ala 410 Ala Tyr Leu Leu Glu Pro 415
 Asn Glu Lys Lys 420 Phe Asn Leu Asp 425 Leu Ala Leu Lys Phe 430 Leu Gly
 Tyr Lys Met 435 Thr Ser Tyr Gln Glu 440 Leu Met Ser Phe 445 Ser Phe Pro Leu
 Phe Gly 450 Phe Ser Phe Ala Asp 455 Val Pro Val Glu Lys 460 Ala Ala Asn Tyr
 Ser Cys Glu Asp Ala Asp 470 Ile Thr Tyr Arg Leu 475 Tyr Lys Thr Leu Ser 480
 Leu Lys Leu His Glu 485 Ala Asp Leu Glu Asn Val 490 Phe Tyr Lys Ile Glu 495
 Met Pro Leu Val 500 Asn Val Leu Ala Arg 505 Met Glu Leu Asn Gly Val Tyr
 Val Asp Thr 515 Glu Phe Leu Lys Lys 520 Leu Ser Glu Glu Tyr 525 Gly Lys Lys
 Leu Glu 530 Glu Leu Ala Glu Glu 535 Ile Tyr Arg Ile Ala 540 Gly Glu Pro Phe
 Asn 545 Ile Asn Ser Pro Lys 550 Gln Val Ser Arg Ile 555 Leu Phe Glu Lys Leu 560
 Gly Ile Lys Pro Arg 565 Gly Lys Thr Thr Lys 570 Thr Gly Asp Tyr Ser Thr 575
 Arg Ile Glu Val 580 Leu Glu Glu Leu Ala 585 Gly Glu His Glu Ile Ile Pro
 Leu Ile Leu 595 Glu Tyr Arg Lys Ile 600 Gln Lys Leu Lys Ser Thr Tyr Ile
 Asp Ala 610 Leu Pro Lys Met Val 615 Asn Pro Lys Thr Gly Arg Ile His Ala
 Ser Phe Asn Gln Thr Gly 630 Thr Ala Thr Gly Arg 635 Leu Ser Ser Ser Asp 640
 Pro Asn Leu Gln Asn 645 Leu Pro Thr Lys Ser 650 Glu Glu Gly Lys Glu Ile 655
 Arg Lys Ala Ile 660 Val Pro Gln Asp Pro 665 Asn Trp Trp Ile Val 670 Ser Ala
 Asp Tyr Ser 675 Gln Ile Glu Leu Arg Ile Leu Ala His Leu Ser Gly Asp 685
 Glu Asn 690 Leu Leu Arg Ala Phe 695 Glu Glu Gly Ile Asp 700 Val His Thr Leu
 Thr 705 Ala Ser Arg Ile Phe 710 Asn Val Lys Pro Glu 715 Glu Val Thr Glu Glu 720
 Met Arg Arg Ala Gly 725 Lys Met Val Asn Phe 730 Ser Ile Ile Tyr Gly Val 735

 Thr Pro Tyr Gly 740 Leu Ser Val Arg Leu 745 Gly Val Pro Val Lys Glu Ala
 Glu Lys Met 755 Ile Val Asn Tyr Phe Val 760 Leu Tyr Pro Lys Val Arg Asp
 Tyr Ile Gln Arg Val Val Ser 775 Glu Ala Lys Glu Lys Gly Tyr Val Arg
 Thr 785 Leu Phe Gly Arg Lys 790 Arg Asp Ile Pro Gln 795 Leu Met Ala Arg Asp 800
 Arg Asn Thr Gln Ala 805 Glu Gly Glu Arg Ile 810 Ala Ile Asn Thr Pro Ile 815
 Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys 825 Leu Ala Met Ile Glu Ile Asp 830
 Arg Glu Leu Lys Glu Arg Lys Met 840 Arg Ser Lys Met Ile 845 Ile Gln Val
 His Asp 850 Glu Leu Val Phe Glu 855 Val Pro Asn Glu Glu 860 Lys Asp Ala Leu
 Val Glu Leu Val Lys Asp 870 Arg Met Thr Asn Val 875 Val Lys Leu Ser Val 880
 Pro Leu Glu Val Asp 885 Val Thr Ile Gly Lys 890 Thr Trp Ser

<212> PRT

<213> *Thermotoga neopolitana*

<220>

5 <223> ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne)

<400> 35

```

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

```

Phe	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Pro	Val	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Tyr
450						455					460				
Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Lys	Ile	Leu	Ser
465					470					475					480
Met	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Glu	Leu	Glu	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Ile	Glu
				485					490					495	
Met	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Phe	Asn	Trp	Val	Tyr
			500					505					510		
Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Lys
		515					520					525			
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Tyr	Gln	Ile	Ala	Gly	Glu	Pro	Phe
		530				535					540				
Asn	Ile	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Val	Ser	Asn	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu
545					550					555					560
Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Thr	Thr	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Thr
				565					570					575	
Arg	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Ile	Ala	Asn	Glu	His	Glu	Ile	Val	Pro
			580					585					590		
Leu	Ile	Leu	Glu	Phe	Arg	Lys	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys	Ser	Thr	Tyr	Ile
		595					600					605			
Asp	Thr	Leu	Pro	Lys	Leu	Val	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Phe	His	Ala
		610				615					620				
Ser	Phe	His	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
625					630					635					640
Pro	Asn	Leu	Gln	Asn	Leu	Pro	Thr	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Ile
				645					650					655	
Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Pro	Asp	Trp	Trp	Ile	Val	Ser	Ala
			660					665					670		
Asp	Tyr	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Gly	Asp
		675					680					685			
Glu	Asn	Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp	Val	His	Thr	Leu
		690				695					700				
Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Asn	Glu	Glu
705					710					715					720
Met	Arg	Arg	Val	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Phe	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val
				725					730					735	
Thr	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Ile	Pro	Val	Lys	Glu	Ala
			740					745					750		
Glu	Lys	Met	Ile	Ile	Ser	Tyr	Phe	Thr	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Arg	Ser
		755					760					765			
Tyr	Ile	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg
		770				775					780				
Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Lys	Arg	Asp	Ile	Pro	Gln	Leu	Met	Ala	Arg	Asp
785					790					795					800
Lys	Asn	Thr	Gln	Ser	Glu	Gly	Glu	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Thr	Pro	Ile
				805					810					815	
Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Ala	Met	Ile	Asp	Ile	Asp
			820					825					830		
Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Asn	Met	Lys	Ser	Arg	Met	Ile	Ile	Gln	Val
		835					840					845			
His	Asp	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Pro	Asp	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu
		850				855					860				
Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asn	Lys	Met	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Val
865					870					875					880
Pro	Leu	Glu	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Gly	Lys	Ser	Trp	Ser			
				885					890						

5

<210> 36
 <211> 876
 <212> PRT
 <213> *Bacillus stearothermophilus*

10

<220>
 <223> ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst)
 <400> 36

Met	Lys	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Val	Ala	Tyr	Arg
1				5					10					15	
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Asn	Asp	Lys	Gly	Ile	His	Thr
			20					25					30		
Asn	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Thr	Met	Met	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu
		35					40					45			
Glu	Gln	Pro	Thr	His	Ile	Leu	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr
	50					55				60					
Phe	Arg	His	Glu	Thr	Phe	Gln	Asp	Tyr	Lys	Gly	Gly	Arg	Gln	Gln	Thr
65					70				75					80	
Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Phe	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Lys
				85					90					95	
Ala	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Tyr	Glu	Leu	Asp	His	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp
			100					105					110		
Ile	Ile	Gly	Thr	Met	Ala	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Ala	Val
		115					120					125			
Lys	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Gln
	130					135					140				
Val	Thr	Val	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Tyr
145					150					155					160
Thr	Pro	Glu	Thr	Val	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Ile
				165					170					175	
Val	Asp	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	Ser	Asp	Asn	Ile	Pro	Gly
			180					185					190		
Val	Pro	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Phe
		195					200					205			
Gly	Thr	Val	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Glu	Ile	Lys	Gly	Glu
	210					215					220				
Lys	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser
225					230					235					240
Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Ile	Cys	Arg	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Leu
			245						250					255	
Asp	Asp	Ile	Val	Tyr	Lys	Gly	Glu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Leu
			260					265					270		
Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gln	Ser	Phe	Leu	Asp	Lys	Met	Ala	Val	Gln
		275					280					285			
Thr	Asp	Glu	Gly	Glu	Lys	Pro	Leu	Ala	Gly	Met	Asp	Phe	Ala	Ile	Ala
	290					295					300				
Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Glu	Met	Leu	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	Val
305					310					315					320
Glu	Val	Val	Gly	Asp	Asn	Tyr	His	His	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	Ala
			325						330					335	
Leu	Ala	Asn	Glu	Arg	Gly	Arg	Phe	Phe	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Leu
		340						345					350		
Ala	Asp	Pro	Lys	Phe	Leu	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Glu	Thr	Lys	Lys	Lys
		355					360					365			
Thr	Met	Phe	Asp	Ser	Lys	Arg	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Lys	Trp	Lys	Gly
	370					375					380				
Ile	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Val	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu
385					390					395					400
Leu	Asp	Pro	Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Lys	Met
				405					410					415	
His	Gln	Tyr	Glu	Ala	Val	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Gly
			420					425					430		
Ala	Lys	Arg	Thr	Val	Pro	Asp	Glu	Pro	Thr	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Ala
		435					440					445			
Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Glu	Glu	Pro	Leu	Met	Asp	Glu
	450					455					460				
Leu	Arg	Arg	Asn	Glu	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Gln	Pro
465					470					475					480
Leu	Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Asn	Met	Glu	Phe	Thr	Gly	Val	Lys	Val	Asp
				485					490					495	
Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Gly	Ala	Glu	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Gln
			500					505					510		
Ala	Val	Glu	Arg	Arg	Ile	Tyr	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Glu	Phe	Asn	Ile
		515					520					525			
Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Gly	Thr	Val	Leu	Phe	Asp	Lys	Leu	Gln	Leu
	530					535					540				

Pro Val Leu Lys Lys Thr Lys Thr Gly Tyr Ser Thr Ser Ala Asp Val
545 550 555 560
Leu Glu Lys Leu Ala Pro His His Glu Ile Val Glu His Ile Leu His
565 570 575
Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu Leu
580 585 590
Lys Val Val His Pro Val Thr Gly Lys Val His Thr Met Phe Asn Gln
595 600 605
Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Val Glu Pro Asn Leu Gln
610 615 620
Asn Ile Pro Ile Arg Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala Phe
625 630 635 640
Val Pro Ser Glu Pro Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser Gln
645 650 655
Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu Ile
660 665 670
Glu Ala Phe Arg Arg Gly Leu Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met Asp
675 680 685
Ile Phe His Val Ser Glu Glu Asp Val Thr Ala Asn Met Arg Arg Gln
690 695 700
Ala Lys Ala Val Asn Phe Gly Ile Val Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr Gly
705 710 715 720
Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Thr Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe Ile
725 730 735
Glu Arg Tyr Phe Ala Ser Phe Pro Gly Val Lys Gln Tyr Met Asp Asn
740 745 750
Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu His
755 760 765
Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val Arg
770 775 780
Ser Phe Ala Glu Arg Thr Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser Ala
785 790 795 800
Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ala Met Ile Asp Leu Ser Val Arg Leu Arg
805 810 815
Glu Glu Arg Leu Gln Ala Arg Leu Leu Glu Val His Asp Glu Leu
820 825 830
Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu Glu Ile Glu Arg Leu Cys Arg Leu Val
835 840 845
Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Ala Leu Arg Val Pro Leu Lys Val
850 855 860
Asp Tyr His Tyr Gly Pro Thr Trp Tyr Asp Ala Lys
865 870 875

<210> 37
5 <211> 877
<212> PRT
<213> *Bacillus caldotenax*

<220>
10 <223> ADN polimerasa de *Bacillus caldotenax* (Bca)

<400> 37

Met	Lys	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Arg
1				5					10					15	
Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Asn	Asp	Lys	Gly	Ile	His	Thr
			20					25					30		
Asn	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Thr	Met	Met	Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu
		35					40					45			
Glu	Glu	Pro	Thr	His	Met	Leu	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Gly	Lys	Thr	Thr
	50					55				60					
Phe	Arg	His	Glu	Ala	Phe	Gln	Glu	Tyr	Lys	Gly	Gly	Arg	Gln	Gln	Thr
65					70				75						80
Pro	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Phe	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Arg
				85				90						95	
Ala	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Tyr	Glu	Leu	Glu	Asn	Tyr	Glu	Ala	Asp	Asp
			100					105					110		
Ile	Ile	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Glu	Gln	Glu	Gly	Phe	Glu	Val
		115					120					125			
Lys	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	His
	130					135					140				
Val	Thr	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Glu	Pro	Tyr
145					150					155					160
Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Ile
				165					170					175	
Val	Asp	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	Ser	Asp	Asn	Ile	Pro	Gly
			180					185					190		
Val	Pro	Gly	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Arg	Gln	Phe
		195					200					205			
Gly	Thr	Val	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Glu	Ile	Lys	Gly	Glu
	210					215					220				
Lys	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Met	Ala	Leu	Leu	Ser
225					230					235					240
Lys	Lys	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Leu	Ser	Leu
			245						250					255	
Asp	Asp	Ile	Ala	Tyr	Gln	Gly	Glu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Leu
			260					265					270		
Phe	Lys	Glu	Leu	Gly	Phe	Gln	Ser	Phe	Leu	Glu	Lys	Met	Glu	Ser	Pro
		275					280					285			
Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Ala	Lys	Met	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala
	290					295					300				
Asp	Arg	Val	Thr	Glu	Glu	Met	Leu	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	Val
305					310					315					320
Glu	Val	Val	Glu	Glu	Asn	Tyr	His	Asp	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	Ile	Ala
				325					330					335	
Val	Val	Asn	Glu	His	Gly	Arg	Phe	Phe	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Leu
			340					345					350		
Ala	Asp	Pro	Gln	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Glu	Thr	Lys	Lys	Lys
		355					360					365			
Ser	Met	Phe	Asp	Ser	Lys	Arg	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Lys	Trp	Lys	Gly
	370					375					380				
Ile	Glu	Leu	Cys	Gly	Val	Ser	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu
385					390					395					400
Leu	Asp	Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Asp	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Met
				405					410					415	
Lys	Gln	Tyr	Glu	Ala	Val	Arg	Pro	Asp	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	Lys	Gly
		420						425					430		
Ala	Lys	Arg	Ala	Val	Pro	Asp	Glu	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Val
		435					440					445			
Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Glu	Arg	Pro	Phe	Leu	Asp	Glu
	450					455					460				
Leu	Arg	Arg	Asn	Glu	Gln	Asp	Arg	Leu	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Gln	Pro
465					470					475					480
Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Ala	Glu	Met	Glu	Phe	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Asp
				485					490					495	
Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Met	Gly	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg

Thr Val Glu 500 Gln Arg Ile Tyr Glu 505 Leu Ala Gly Gln Glu 510 Phe Asn Ile
 Asn Ser 515 Pro Lys Gln Leu Gly 520 Val Ile Leu Phe Glu 525 Lys Leu Gln Leu
 Pro 530 Val Leu Lys Lys Ser 535 Lys Thr Gly Tyr Ser 540 Thr Ser Ala Asp Val
 545 Leu Glu Lys Leu Ala 550 Pro Tyr His Glu Ile Val Glu Asn Ile Leu Gln
 565 His Tyr Arg Gln Leu Gly Lys Leu Gln 570 Ser Thr Tyr Ile Glu Gly Leu
 580 Leu Lys Val Arg Pro Asp Thr 585 Lys Lys Val His Thr Ile Phe Asn
 595 Gln Ala Leu Thr Gln Thr Gly Arg Leu Ser Ser Thr Glu Pro Asn Leu
 610 Gln Asn Ile Pro Ile Arg 615 Leu Glu Glu Gly Arg Lys Ile Arg Gln Ala
 625 Phe Val Pro Ser Glu 630 Ser Asp Trp Leu Ile Phe Ala Ala Asp Tyr Ser
 645 Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Ile Ala Glu Asp Asp Asn Leu
 660 Met Glu Ala Phe Arg Arg Asp Leu 665 Asp Ile His Thr Lys Thr Ala Met
 675 Asp Ile Phe Gln Val Ser Glu 680 Asp Glu Val Thr Pro 685 Asn Met Arg Arg
 690 Gln Ala Lys Ala Val Asn 710 Phe Gly Ile Val Tyr 715 Gly Ile Ser Asp Tyr
 705 Gly Leu Ala Gln Asn Leu Asn Ile Ser Arg Lys Glu Ala Ala Glu Phe
 725 Ile Glu Arg Tyr Phe Glu Ser Phe Pro 730 Gly Val Lys Arg Tyr Met Glu
 740 Asn Ile Val Gln Glu Ala Lys Gln 745 Lys Gly Tyr Val Thr Thr Leu Leu
 755 His Arg Arg Arg Tyr Leu Pro Asp Ile Thr Ser Arg Asn Phe Asn Val
 770 Arg Ser Phe Ala Glu Arg Met Ala Met Asn Thr Pro Ile Gln Gly Ser
 785 Ala Ala Asp Ile Ile 790 Lys Lys Ala Met Ile 795 Asp Leu Asn Ala Arg Leu
 805 Lys Glu Glu Arg Leu Gln Ala Arg Leu Leu Leu Gln Val His Asp Glu
 820 Leu Ile Leu Glu Ala Pro Lys Glu 825 Glu Met Glu Arg Leu Cys Arg Leu
 835 Val Pro Glu Val Met Glu Gln Ala Val Thr Leu Arg Val Pro Leu Lys
 850 Val Asp Tyr His Tyr Gly 855 Ser Thr Trp Tyr Asp 860 Ala Lys
 865 870 875

- 5 <210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> motivo de polimerasa sintética correspondiente a la mutación D580X de Z05

 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Ser o Thr

 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de Asp o Glu

 <400> 38

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

<210> 39
<211> 831
5 <212> PRT
<213> *Carboxydothemus hydrogenoformans*

<220>
10 <223> ADN polimerasa de *Carboxydothemus hydrogenoformans* (Chy)

<400> 39
Met Gly Lys Val Val Leu Val Asp Gly Asn Ser Leu Leu His Arg Ala
1 5 10 15
Phe Phe Ala Leu Pro Pro Leu Lys Thr Thr Lys Gly Glu Pro Thr Gly
20 25 30
Ala Val Tyr Glu Phe Leu Thr Met Leu Phe Arg Val Ile Lys Asp Glu
35 40 45
Lys Pro Glu Tyr Leu Ala Val Ala Phe Asp Ile Ser Arg Lys Thr Phe
50 55 60
Arg Thr Glu Gln Phe Thr Ala Tyr Lys Gly His Arg Lys Glu Ala Pro
65 70 75 80
Asp Glu Leu Val Pro Gln Phe Ala Leu Val Arg Glu Val Leu Lys Val
85 90 95
Leu Asn Val Pro Tyr Ile Glu Leu Asp Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Ile
100 105 110
Ile Gly His Leu Ser Arg Ala Phe Ala Gly Gln Gly His Glu Val Val
115 120 125
Ile Tyr Thr Ala Asp Arg Asp Met Leu Gln Leu Val Asp Glu Lys Thr
130 135 140
Val Val Tyr Leu Thr Lys Lys Gly Ile Thr Glu Leu Val Lys Met Asp
145 150 155 160
Leu Ala Ala Ile Leu Glu Asn Tyr Gly Leu Lys Pro Lys Gln Leu Val
165 170 175
Asp Val Lys Gly Leu Met Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile Pro Gly Val
180 185 190
Pro Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Asp Leu Ile Lys Thr Tyr Gly
195 200 205
Ser Val Glu Glu Val Leu Ala Arg Lys Asp Glu Leu Lys Pro Lys Leu
210 215 220
Arg Glu Lys Leu Ala Glu His Glu Asn Leu Ala Lys Ile Ser Lys Gln
225 230 235 240
Leu Ala Thr Ile Leu Arg Glu Ile Pro Leu Glu Ile Ser Leu Glu Asp
245 250 255
Leu Lys Val Lys Glu Pro Asn Tyr Glu Glu Val Ala Lys Leu Phe Leu
260 265 270
His Leu Glu Phe Lys Ser Phe Leu Lys Glu Ile Glu Pro Lys Ile Lys
275 280 285
Lys Glu Tyr Gln Glu Gly Lys Asp Leu Val Gln Val Glu Thr Val Glu
290 295 300
Thr Glu Gly Gln Ile Ala Val Val Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Val Asp
305 310 315 320
Asp Gly Glu Lys Thr Lys Phe Tyr Ser Leu Asp Arg Leu Asn Glu Ile
325 330 335
Glu Glu Ile Phe Arg Asn Lys Lys Ile Ile Thr Asp Asp Ala Lys Gly
340 345 350
Ile Tyr His Val Cys Leu Glu Lys Gly Leu Thr Phe Pro Glu Val Cys
355 360 365
Phe Asp Ala Arg Ile Ala Ala Tyr Val Leu Asn Pro Ala Asp Gln Asn
370 375 380
Pro Gly Leu Lys Gly Leu Tyr Leu Lys Tyr Asp Leu Pro Val Tyr Glu
385 390 395 400
Asp Val Ser Leu Asn Ile Arg Gly Leu Phe Tyr Leu Lys Lys Glu Met

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una ADN polimerasa mejorada que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene una mayor eficacia de transcriptasa inversa en comparación con una ADN polimerasa de control, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ. ID NO: 1 es F, y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es Y.
- 10 2. La ADN polimerasa de la reivindicación 1, en la que la ADN polimerasa comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
- 15 3. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en L, G, T, Q, A, S, N, R y K.
- 20 4. La ADN polimerasa de la reivindicación 3, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es G.
- 25 5. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 se selecciona del grupo que consiste en K, S, R, G o A.
- 30 6. La ADN polimerasa de la reivindicación 5, en la que el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K.
- 35 7. La ADN polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el aminoácido de la ADN polimerasa correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es F, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es K y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es G y en la que la ADN polimerasa de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ADN polimerasa, excepto que el aminoácido de la ADN polimerasa de control correspondiente a la posición 698 de SEQ ID NO: 1 es Y, el aminoácido correspondiente a la posición 709 de SEQ ID NO: 1 es I y el aminoácido correspondiente a la posición 580 de SEQ ID NO: 1 es D.
- 40 8. Un ácido nucleico recombinante que codifica la ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 8.
- 50 10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
- 55 11. Un procedimiento de producción de una ADN polimerasa, comprendiendo dicho procedimiento:
cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica la ADN polimerasa.
- 60 12. Un procedimiento para llevar a cabo la extensión del cebador, que comprende:
poner en contacto una ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con un cebador, un molde de polinucleótido y nucleósidos trifosfato en condiciones adecuadas para la extensión del cebador, produciendo de este modo un cebador extendido.
- 65 13. Un kit para producir un cebador extendido, que comprende:
al menos un recipiente que proporciona una ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además uno o más recipientes adicionales seleccionados del grupo que consiste en:
(a) un recipiente que proporciona un cebador hibridable, en condiciones de extensión del cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado;
(b) un recipiente que proporciona nucleósidos trifosfato; y
(c) un recipiente que proporciona un tampón adecuado para la extensión del cebador.

15. Una mezcla de reacción que comprende una ADN polimerasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, al menos un cebador, un molde de polinucleótido y nucleósidos trifosfato.

FIGURA 1

Z05	LSQELAIPIYEEA	VA	F	IE	R	Y	FQ	S	F	P	K	V	R	AWIEKTLE	(SEQ	ID	NO:12)
Taq	LSQELAIPIYEEA	QA	F	IE	R	Y	FQ	S	F	P	K	V	R	AWIEKTLE	(SEQ	ID	NO:13)
Tfi	LSQELSIPIYEEA	AA	F	IE	R	Y	FQ	S	F	P	K	V	R	AWIAKTLE	(SEQ	ID	NO:14)
Tfl	LSGELSIPIYEEA	VA	F	IE	R	Y	FQ	S	Y	P	K	V	R	AWIEGTLE	(SEQ	ID	NO:15)
Sps17	LSQELSIPIYEEA	AA	F	IE	R	Y	FQ	S	F	P	K	V	R	AWIAKTLE	(SEQ	ID	NO:16)
Tth	LSQELAIPIYEEA	VA	F	IE	R	Y	FQ	S	F	P	K	V	R	AWIEKTLE	(SEQ	ID	NO:17)
Tca	LSQELAIPIYEEA	VA	F	IE	R	Y	FQ	S	F	P	K	V	R	AWIEKTLE	(SEQ	ID	NO:18)
Tma	LSVRLGVPVKEA	EK	M	IV	N	Y	FV	L	Y	P	K	V	R	DYIQRVVS	(SEQ	ID	NO:19)
Tne	LSVRLGIPVKEA	EK	M	II	S	Y	FT	L	Y	P	K	V	R	SYIQQVVA	(SEQ	ID	NO:20)
Taf	LSKRIGLSVSET	KK	I	ID	N	Y	FR	Y	Y	K	G	V	F	EYLKRMKD	(SEQ	ID	NO:21)
Dra	LSNDLGIPYAEA	AT	F	IE	I	Y	FA	T	Y	P	G	I	R	RYINHTLD	(SEQ	ID	NO:23)
Bst	LAQNLNITRKEA	AE	F	IE	R	Y	FA	S	F	P	G	V	K	QYMDNIVQ	(SEQ	ID	NO:24)
Bca	LAQNLNISRKEA	AE	F	IE	R	Y	FE	S	F	P	G	V	K	RYMENIVQ	(SEQ	ID	NO:25)
	-----EX ₁ X ₂ X ₃ X ₄	IX ₅ X ₆ X ₇	FX ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂	X ₁₃ X ₁₄	-----										(SEQ	ID	NO:26)

FIGURA 2

A. Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05)													
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tfl	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bst	Bca
Z05		0,864	0,833	0,859	0,839	0,962	0,958	0,459	0,374	0,368	0,359	0,407	0,408
Taq	0,864		0,831	0,854	0,836	0,872	0,864	0,468	0,382	0,368	0,351	0,397	0,397
Tfi	0,833	0,831		0,82	0,991	0,829	0,824	0,45	0,371	0,375	0,353	0,405	0,397
Tfl	0,859	0,854	0,82		0,824	0,853	0,848	0,462	0,381	0,374	0,356	0,397	0,398
Sps17	0,839	0,836	0,991	0,824		0,835	0,83	0,452	0,375	0,377	0,355	0,407	0,399
Tth	0,962	0,872	0,829	0,853	0,835		0,989	0,463	0,373	0,367	0,358	0,406	0,406
Tca	0,958	0,864	0,824	0,848	0,83	0,989		0,46	0,371	0,365	0,356	0,404	0,404
Dra	0,459	0,468	0,45	0,462	0,452	0,463	0,46		0,334	0,325	0,314	0,338	0,339
Tma	0,374	0,382	0,371	0,381	0,375	0,373	0,371	0,334		0,854	0,567	0,37	0,377
Tne	0,368	0,368	0,375	0,374	0,377	0,367	0,365	0,325	0,854		0,558	0,377	0,376
Taf	0,359	0,351	0,353	0,356	0,355	0,358	0,356	0,314	0,567	0,558		0,356	0,364
Bst	0,407	0,397	0,405	0,397	0,407	0,406	0,404	0,338	0,37	0,377	0,356		0,881
Bca	0,408	0,397	0,397	0,398	0,399	0,406	0,404	0,339	0,377	0,376	0,364	0,881	
B. Identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa únicamente (correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05)													
Nombre	Z05	Taq	Tfi	Tfl	Sps17	Tth	Tca	Dra	Tma	Tne	Taf	Bst	Bca
Z05		0,901	0,845	0,891	0,845	0,975	0,973	0,563	0,483	0,478	0,44	0,498	0,49
Taq	0,901		0,879	0,901	0,877	0,906	0,901	0,561	0,488	0,473	0,44	0,503	0,495
Tfi	0,845	0,879		0,857	0,997	0,853	0,853	0,566	0,495	0,49	0,449	0,512	0,49
Tfl	0,891	0,901	0,857		0,855	0,889	0,889	0,571	0,492	0,48	0,444	0,494	0,485
Sps17	0,845	0,877	0,997	0,855		0,853	0,853	0,566	0,495	0,49	0,449	0,512	0,49
Tth	0,975	0,906	0,853	0,889	0,853		0,99	0,563	0,478	0,473	0,437	0,496	0,488
Tca	0,973	0,901	0,853	0,889	0,853	0,99		0,563	0,478	0,473	0,437	0,496	0,488
Dra	0,563	0,561	0,566	0,571	0,566	0,563	0,563		0,45	0,448	0,426	0,474	0,454
Tma	0,483	0,488	0,495	0,492	0,495	0,478	0,478	0,45		0,883	0,622	0,474	0,475
Tne	0,478	0,473	0,49	0,48	0,49	0,473	0,473	0,448	0,883		0,615	0,476	0,473
Taf	0,44	0,44	0,449	0,444	0,449	0,437	0,437	0,426	0,622	0,615		0,46	0,473
Bst	0,498	0,503	0,512	0,494	0,512	0,496	0,496	0,474	0,474	0,476	0,46		0,898
Bca	0,49	0,495	0,49	0,485	0,49	0,488	0,488	0,454	0,475	0,473	0,473	0,898	

FIGURA 3

A. Identidades de secuencia en toda la enzima polimerasa I (correspondiente a los aminoácidos 1-834 de Z05)							
Nombre	Z05	Tth	Tfi	Tfl	Tca	Taq	Sps17
Z05		0,962	0,833	0,859	0,958	0,864	0,839
Tth	0,962		0,829	0,853	0,989	0,872	0,835
Tfi	0,833	0,829		0,82	0,824	0,831	0,991
Tfl	0,859	0,853	0,82		0,848	0,854	0,824
Tca	0,958	0,989	0,824	0,848		0,864	0,83
Taq	0,864	0,872	0,831	0,854	0,864		0,836
Sps17	0,839	0,835	0,991	0,824	0,83	0,836	
B. Identidades de secuencia en el subdominio de polimerasa únicamente (correspondiente a los aminoácidos 420-834 de Z05)							
Nombre	Z05	Tth	Tfi	Tfl	Tca	Taq	Sps17
Z05		0,975	0,845	0,891	0,973	0,901	0,845
Tth	0,975		0,853	0,889	0,99	0,906	0,853
Tfi	0,845	0,853		0,857	0,853	0,879	0,997
Tfl	0,891	0,889	0,857		0,889	0,901	0,855
Tca	0,973	0,99	0,853	0,889		0,901	0,853
Taq	0,901	0,906	0,879	0,901	0,901		0,877
Sps17	0,845	0,853	0,997	0,855	0,853	0,877	