

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 186**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2015 PCT/EP2015/001703**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16026574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2015 E 15770444 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3183340**

54 Título: **Exonucleasas termolábiles**

30 Prioridad:

19.08.2014 GB 201414745

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**ARCTICZYMES AS (50.0%)
PO Box 6463
9294 Tromsø, NO y
UNIVERSITETET I TROMSØ - NORGES
ARKTISKE UNIVERSITET (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SOLSTAD, TERESE;
ANDREASSEN, ELISABETH, LILL;
LORENTZEN, MARIT, SJO;
LANES, OLAV;
ELDE, MORTEN;
LARSEN, ATLE, NORALF;
PIOTROWSKI, YVONNE y
WILLASSEN, NILS, PEDER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 742 186 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

Exonucleasas termolábiles

5 La presente invención se refiere al uso de exonucleasas termolábiles para eliminar el ADN monocatenario de las muestras que contienen moléculas biológicas, en particular, los productos de amplificación de ácido nucleico o reacciones de transcripción inversa (p. ej., ADN, ARN bicatenario y dúplex ADN:ARN). La invención se puede ver en particular en lo relativo al refinamiento de las muestras que contienen ADN, ARN bicatenario, y/o dúplex de ADN:ARN por eliminación de ADN monocatenario. Más específicamente, la invención se refiere a la eliminación del exceso de cebadores de oligodesoxirribonucleótidos de los productos de amplificación de ácido nucleico o reacciones de transcripción inversa. La eliminación del exceso de cebadores de oligodesoxirribonucleótidos de los productos de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos puede aumentar el análisis de la secuencia aguas abajo de los productos ya que la interferencia del exceso de cebadores de oligodesoxirribonucleótidos se reduce. La presente invención se refiere además, por lo tanto, a métodos para optimizar el análisis de la secuencia de los productos de una amplificación de ácido nucleico o reacciones de transcripción inversa, p. ej., por secuenciación de ácidos nucleicos o matriz de sonda de oligonucleótidos. Se proporcionan también métodos para la optimización del análisis de la secuencia de ácidos nucleicos que no han sido obtenidos a partir de una reacción de amplificación de ácido nucleico.

20 Las nucleasas son enzimas que rompen los enlaces fosfodiéster en el esqueleto de azúcar-fosfato de los polímeros de ADN o ARN. Las nucleasas son un grupo muy diverso de enzimas. El modo de acción puede ser altamente específico o muy general dependiendo de su función diana. Las nucleasas pueden preferir polímeros monocatenarios (mc) o bicatenarios (bc). Algunas nucleasas escinden en secuencias específicas de nucleótidos (p. ej., endonucleasas de restricción), mientras que otras escinden en posiciones de los polímeros independientes de una secuencia nucleotídica. En la célula, las nucleasas tienen una variedad de funciones y participan en la replicación del ADN, recombinación, mutación, transcripción y reparación además de romper piezas redundantes de ARN y ADN. Las nucleasas también pueden tener un papel en los mecanismos de defensa del huésped.

30 Todas las nucleasas se pueden dividir en tres clases principales basándose en si su mecanismo catalítico implica dos, uno o ningún ion metálico (superfamilias de las nucleasas dependientes de dos iones metálicos, dependientes de un ion metálico e independientes de metal). Cada una de estas clases incluye muchas familias y superfamilias diferentes. Para más detalles acerca de la clasificación de las nucleasas, véase Yang, W., 2011, "Nucleases: diversity of structure, function and mechanism". Q Rev Biophys 44(1): 1-93.

35 Basándose en la preferencia del sustrato, las nucleasas pueden clasificarse como desoxirribonucleasas (DNasas) o ribonucleasas (RNasas), es decir, enzimas que escinden los enlaces fosfodiéster de ADN o ARN, respectivamente. Basándose en las posiciones de los enlaces escindidos dentro de los polímeros de ADN o ARN, las nucleasas pueden clasificarse como endonucleasas o exonucleasas. Las endonucleasas escinden enlaces fosfodiéster del ADN o ARN en las posiciones dentro del polímero, mientras que las exonucleasas participan en el recorte de los extremos de los polímeros de ARN y ADN, escindiendo el enlace fosfodiéster más externo en una cadena. Las exonucleasas se pueden dividir en dos grupos por la polaridad 5' a 3' frente a 3' a 5'. Las nucleasas también pueden mostrar especificidad entre los ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios. Una nucleasa particular puede ser estrictamente monocatenaria específica, monocatenaria preferencial, estrictamente bicatenaria específica, bicatenaria preferencial o una nucleasa que escinda ambas.

45 Se conoce un número de enzimas exonucleasa, y entre ellas, las enzimas de *Escherichia coli* son las mejores caracterizadas. Una característica común para exonucleasas es su alta procesividad que degrada hasta 1.000 nucleótidos en un único evento de unión al liberar mononucleótidos. Se notifica que la exonucleasa I (ExoI), la exonucleasa VII (ExoVII) y la exonucleasa RecJ son exonucleasas específicas de ADNmc implicadas en la reparación del ADN. Sin embargo, su polaridad de acción es diferente. ExoI posee una actividad de exonucleasa 3' a 5' mientras que RecJ solo posee una actividad 5' a 3'. A diferencia de las otras exonucleasas, ExoVII posee actividades de exonucleasa tanto 5' a 3' como 3' a 5'.

55 La determinación de la secuencia de nucleótidos en ácidos nucleicos, p. ej., ADN y ARN, se ha convertido en un objetivo importante en la biología molecular moderna. Por medio del análisis, se puede obtener tal información de secuencias en la fuente del ácido nucleico. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica de ciertos elementos genéticos evolutivamente variables puede proporcionarse como una indicación en cuanto a la identidad del organismo del que se deriva. Por consiguiente, la detección de ácido nucleico que porta una característica nucleotídica característica de un microorganismo particular en una muestra puede indicar la presencia del microorganismo en la muestra o incluso cuantificar las cantidades de tales organismos en la muestra. El análisis de secuencia también permite ayudar en la clasificación taxonómica de organismos superiores, que pueden ser importantes en los campos técnicos tales como la agricultura y la ciencia veterinaria. En los seres humanos, el análisis de la secuencia nucleotídica puede identificar individuos y su linaje, teniendo, de este modo, aplicaciones forenses, y puede identificar médica y fisiológicamente genotipos relevantes, p. ej., mutaciones. La secuenciación de los transcritos de ARN de una célula o grupo de células diana (p. ej., un tejido, un tumor o un cultivo) puede dar información sobre el transcriptoma de la diana, que, a su vez, puede tener numerosas aplicaciones en los campos médicos y científicos. El ácido nucleico basado en los marcadores de identidad que portan secuencias de nucleótidos únicas también está disponible, cuya detección requiere el análisis

de la secuencia nucleotídica del marcador. En otras aplicaciones representativas, el experto en la materia puede desear determinar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico con la que él/ella está trabajando, quizás ya sea para confirmar que una manipulación ha tenido éxito o para entender la conformación de una nueva molécula.

5 El análisis de la secuencia de ácidos nucleicos puede adoptar la forma de una técnica de secuenciación. El método de secuenciación de dideoxinucleótidos de Sanger es una técnica bien conocida y ampliamente usada para la
 10 secuenciación de ácidos nucleicos. Sin embargo, los enfoques denominados más recientemente de "próxima generación" o "segunda generación" (en referencia al método de dideoxinucleótidos de Sanger como el enfoque de "primera generación") se han generalizado. Estas nuevas técnicas se caracterizan por altos rendimientos, p. ej., como
 consecuencia del uso de reacciones de secuenciación paralelas, p. ej., masivamente paralelas, o por etapas que
 requieren menos tiempo. Diversos métodos de secuenciación de alto rendimiento proporcionan la secuenciación de
 una sola molécula y emplean técnicas tales como pirosecuenciación, secuenciación terminadora reversible,
 15 secuenciación con sonda escindible por ligamiento, secuenciación con sonda no escindible por ligamiento, nanobolas
 de ADN, y secuencia de una sola molécula en tiempo real.

El análisis de la secuencia de ácido nucleico también puede adoptar la forma de un enfoque basado en una sonda de
 20 hibridación de oligonucleótidos en el que la presencia de una secuencia de nucleótidos diana es confirmada al detectar
 un evento de hibridación específico entre una sonda y su diana. En estos enfoques, la sonda de oligonucleótidos se
 proporciona a menudo como una parte de una matriz más amplia, p. ej., una micromatriz de ácido nucleico
 inmovilizada.

Otros enfoques están disponibles y pueden ser desarrollados en el futuro, pero como tema común es típico, aunque
 no esencial, que cada uno se llevan a cabo en el ácido nucleico que ha sido amplificado en una reacción de
 25 amplificación de ácidos nucleicos o sintetizado por una reacción de transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés).
 La amplificación se requiere normalmente para asegurar que hay suficiente muestra de ácido nucleico para el análisis
 de la secuencia. Tales técnicas incluyen las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés),
 reacción de amplificación de la ligasa (LAR, por sus siglas en inglés); también conocida como reacción en cadena de
 la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés)), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés),
 30 amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA, por sus siglas en inglés; también conocida como
 3SR (replicación de secuencia autosostenida)) y puede estar precedida por una reacción de transcripción inversa.
 Estas técnicas de amplificación y técnicas de transcripción inversa dan lugar a menudo a la presencia de un ADN
 monocatenario sin diana en el producto final, debido principalmente a que un exceso de un cebador de
 oligodesoxirribonucleótido monocatenario es suministrado con frecuencia inicialmente, pero los amplicones de ADN
 monocatenario también pueden surgir cuando la polimerización es incompleta. Dicho ADN monocatenario interfiere
 35 con el análisis de secuencia del producto de amplificación por competición con los otros reactivos, p. ej., sondas de
 oligonucleótidos, y se someten a sí mismos a secuenciación, contaminando de este modo la información de
 secuenciación generada por la reacción. Ello reduce potencialmente la sensibilidad y la exactitud del análisis.

Para mitigar dicha interferencia, el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o una reacción de
 40 transcripción inversa se puede tratar con una exonucleasa para degradar ADN monocatenario (p. ej., cebadores no
 incorporados). También es posible incluir un tratamiento para efectuar la desfosforilación de cualquier NTP no
 incorporado (p. ej., dNTP), p. ej., un tratamiento con una fosfatasa alcalina, por ejemplo, la fosfatasa alcalina de gamba
 lábil al calor (SAP, por sus siglas en inglés). Actualmente, la exonucleasa I de *E. coli* (ExoI) es la exonucleasa más
 comúnmente usada en dichas reacciones. La reacción de la exonucleasa I se realiza normalmente mediante la adición
 45 de la enzima al producto de la amplificación del ácido nucleico o la reacción de transcripción inversa e incubación
 durante 15 min a 37 °C. Sin embargo, para impedir que la exonucleasa interfiera en los procesos aguas abajo, p. ej.,
 análisis de secuencias, es necesario por lo general inactivar la enzima. Con la exonucleasa I comúnmente usada de
E. coli, la inactivación requiere la incubación de la enzima a 80 °C durante 15-20 minutos. El tiempo prolongado de
 inactivación y la temperatura de inactivación relativamente alta hacen que el proceso sea largo y relativamente duro
 50 en la muestra de interés.

RecJ y ExoVII también se han propuesto para este uso, pero no se usan comúnmente puesto que RecJ tiene una
 actividad específica baja y ExoVII consiste en dos cadenas polipeptídicas diferentes. Las condiciones de inactivación
 recomendadas para RecJ implican una incubación de 20 min a 65 °C y para ExoVII una incubación de 10 minutos a
 55 95 °C. El documento WO 2004/003136 desvela por ejemplo métodos de determinación de diferencias de secuencia
 que incluyen etapas de eliminación de ácidos nucleicos monocatenarios al usar una exonucleasa I lábil al calor de *E.*
coli, que es activa a 37 °C e inactiva por incubación durante 20 minutos a 80 °C.

Hay una necesidad, por lo tanto, de proporcionar una enzima capaz de degradar específicamente ADN monocatenario
 60 en menos de 15 minutos y/o que pueda ser esencialmente inactivada de manera irreversible a una temperatura inferior
 a 65 °C y/o en menos de 15-20 minutos. Tal enzima termolábil (también denominada de manera intercambiable en la
 presente memoria como enzima lábil al calor (HL, por sus siglas en inglés)) mejoraría las técnicas de biología molecular
 haciéndolas significativamente más eficientes en el tiempo y más delicadas en la molécula de muestra de interés.

65 Puede ser deseable eliminar ADN monocatenario de una muestra en otros contextos. Por ejemplo, para digerir el ADN
 monocatenario al cual se une una proteína de unión de ácido nucleico. En estos contextos, una enzima capaz de

degradar específicamente ADN monocatenario en menos de 15 minutos y/o que pueda ser esencialmente inactivada de manera irreversible a una temperatura inferior a 65 °C y/o en menos de 15-20 minutos sería ventajosa sobre la exonucleasa I, RecJ y ExoVII de *E. coli* por las mismas razones de eficiencia del tiempo y el procesamiento cuidadoso analizado anteriormente.

5 Ahora se ha descubierto que homólogos del gen *sbcB* de *E. coli* (que codifica la exonucleasa I de *E. coli*) obtenido a partir de especies de los géneros *Shewanella*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Psychromonas* y *Moritella* hallados en campos de agua fría, p. ej., *Moritella viscosa* y *Vibrio wodanis* tienen sorprendentemente estas propiedades ventajosas.

10 La presente invención proporciona métodos de eliminación de ADN monocatenario de una muestra, métodos de amplificación de ácido nucleico, métodos de transcripción inversa y métodos de análisis de la secuencia de ácidos nucleicos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 Se desvela una exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma de uso en los métodos de la invención, teniendo dicha exonucleasa la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50 % idéntica a la misma, en el que dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma

20 (i) es sustancialmente inactiva de forma irreversible por calentamiento a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 10 minutos en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM;

(ii) es sustancialmente específica para ADN monocatenario; y

(iii) tiene una actividad de exonucleasa 3'-5'.

25 Por "al menos aproximadamente 50 %", se entiende que la identidad de secuencia puede ser al menos de 49 %, 49,5 % o 49,9 %. En realizaciones preferidas, la exonucleasa de uso en la invención tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, preferentemente, al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95%, p. ej., al menos 98 % o 99 % o 99,5 %, idéntica a la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la exonucleasa consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los fragmentos enzimáticamente activos de los mismos también se desvelan.

30 Una exonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 puede obtenerse a partir de un organismo procariótico que se encuentra en campos de agua fría. Por "procariota" se entiende cualquier organismo que carece de un núcleo de célula, es decir, cualquier organismo a partir de los dominios Bacteria y Archaea. Preferentemente, el organismo es una bacteria. Preferentemente, el organismo no es una eucariota, p. ej., un organismo clasificado en los reinos taxonómicos Animalia, Plantae, Fungi o Protista. Más preferentemente, el organismo se selecciona entre los géneros *Shewanella*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Psychromonas* y *Moritella*.

35 En ciertas realizaciones, una exonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 puede seleccionarse entre SEQ ID NO: 2 (el homólogo *SbcB* de *Halomonas* sp.), SEQ ID NO: 3 (el homólogo de *SbcB* de *Vibrio wodanis*), SEQ ID NO: 4 (el homólogo de *SbcB* de *Psychromonas* sp.) o SEQ ID NO: 5 (el homólogo de *SbcB* de *Moritella viscosa*).

40 Así, se desvela una exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma de uso en los métodos de la invención, teniendo dicha exonucleasa la secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

45 (a) SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
 (b) SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
 (c) SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
 (d) SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 65 % idéntica a la misma,
 50 o
 (e) SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,

en el que dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma

55 (i) es sustancialmente inactiva de forma irreversible por calentamiento a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 10 minutos en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM;

(ii) es sustancialmente específica para ADN monocatenario, y

(iii) tiene una actividad de exonucleasa 3'-5'.

60 En realizaciones preferidas, la exonucleasa de uso en la invención tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95%, p. ej., al menos 98 % o 99 % o 99,5 %, idéntica a las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En otras realizaciones, la exonucleasa consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5. Los fragmentos enzimáticamente activos de los mismos también se desvelan.

65

El porcentaje de identidad de secuencia según la invención puede ser calculado usando cualquiera de los algoritmos ampliamente disponibles, p. ej., usando el programa de alineamiento de secuencias múltiples Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>) que usa parámetros por defecto (penalización por apertura de hueco de ADN = 15,0; penalización por extensión de hueco de ADN = 6,66; matriz de ADN = identidad; penalización por apertura de hueco de proteína = 10,0; penalización por extensión de hueco de proteína = 0,2; matriz de proteína = Gonnet; Proteína/ADN ENDGAP = -1; Proteína/ADN GAPDIST = 4)

Las variantes de las SEQ ID NO: mencionadas anteriormente incluyen secuencias de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos de dichas SEQ ID NO: han sido objeto de sustitución conservadora o han sido reemplazadas con una versión modificada de dichos uno o más aminoácidos o aminoácido que no es de origen natural, p. ej., isómeros D de dichos uno o más aminoácidos. Preferentemente, dichas sustituciones y modificaciones son sustituciones y modificaciones silenciosas por que las formas modificadas de las exonucleasas de uso en la invención tienen las mismas características enzimáticas y de inactivación que las formas no modificadas.

Una exonucleasa es una enzima capaz de escindir un nucleótido de uno o más extremos terminales de una cadena de polinucleótidos, sin especificidad de secuencias de nucleótidos, por hidrólisis de un enlace fosfodiéster internucleotídico. Normalmente, las exonucleasas escinden nucleótidos, ya sea en el extremo terminal 5' (y se caracterizan así pues como exonucleasas 5'-3' o por tener actividad de exonucleasa 5'-3') o en el extremo terminal 3' (y se caracterizan así pues como exonucleasas 3'-5' o por tener actividad de exonucleasa 3'-5'). Según la invención, las exonucleasas de uso son exonucleasas 3'-5'. En algunas realizaciones, las exonucleasas de uso en la invención no tienen sustancialmente actividad de exonucleasa 5'-3' contra ADN monocatenario, por lo cual se entiende que, en concentraciones de 0,1 a 1,0 U/μl en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM, las exonucleasas de uso en la invención muestran una actividad de exonucleasa 5'-3' escasa, insignificante o esencialmente nula contra ADN monocatenario en el transcurso de una incubación de 1 hora. Expresado numéricamente, menos de 10 %, p. ej., menos de 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %, de un sustrato de ADN monocatenario (p. ej., aproximadamente 5 pmol de dicho sustrato, que puede ser por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido) en tales condiciones será degradado en una dirección 5'-3'. Preferentemente, no será detectable ninguna actividad de exonucleasa 5'-3' a tales concentraciones.

El experto en la materia será capaz de idear un ensayo adecuado para medir las actividades de exonucleasa 5'-3' y 3'-5' relativas. Por ejemplo, el ensayo de exonucleasa a base de gel descrito en los Ejemplos usa un oligodesoxirribonucleótido monocatenario marcado en 5' (FAM) para controlar la degradación del extremo terminal 3' de tal forma que una actividad producirá fragmentos detectables de longitud variable acortada del extremo terminal 3'. La degradación del extremo 5' producirá solo nucleótidos marcados únicos. Para confirmar estos resultados, el mismo ensayo puede alternativamente llevarse a cabo con un sustrato de ADN monocatenario marcado en 3' y debe observarse el patrón de gel opuesto.

Por "sustancialmente específico para ADN monocatenario", se quiere decir que la actividad de la exonucleasa de uso en la invención contra ADN bicatenario es igual o inferior a 15 % de la actividad contra una cantidad equivalente de ADN monocatenario en las mismas condiciones, p. ej., una concentración enzimática de aproximadamente 0,1 U/μl y aproximadamente 5 pmol de sustrato de ácido nucleico en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM con un tiempo de incubación de 10 minutos o menos y una temperatura de incubación de aproximadamente 30 °C. En otras realizaciones, la actividad de la exonucleasa de uso en la invención contra ADN bicatenario es igual o inferior a 10 %, p. ej., igual o inferior a 8 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 %, 0,1 % o 0,05 %, de la actividad contra una cantidad equivalente de ADN monocatenario en las mismas condiciones.

En otras realizaciones más específicas, "sustancialmente específico para ADN monocatenario" también quiere decir que la actividad de la exonucleasa de uso en la invención contra ARN monocatenario es igual o inferior a 15 % de la actividad contra una cantidad equivalente de ADN monocatenario en las mismas condiciones, p. ej., una concentración enzimática de aproximadamente 0,1 U/μl y aproximadamente 5 pmol de sustrato de ácido nucleico en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM con un tiempo de incubación de 10 minutos o menos y una temperatura de incubación de aproximadamente 30 °C. En otras realizaciones, la actividad de la exonucleasa de uso en la invención contra ARN monocatenario es igual o inferior a 10 %, p. ej., igual o inferior a 8 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 %, 0,1 % o 0,05 %, de la actividad contra una cantidad equivalente de ADN monocatenario en las mismas condiciones.

En ciertas realizaciones, por "sustancialmente específico para ADN monocatenario" se quiere decir que la exonucleasa de uso en la invención degrada ADN monocatenario pero a concentraciones de aproximadamente 0,1 U/μl en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM, existe una degradación escasa, insignificante o esencialmente nula de aproximadamente 5 pmol de un sustrato adecuado de ADN bicatenario (p. ej., un oligodesoxirribonucleótido bicatenario) en el transcurso de una incubación de 10 minutos. Expresado numéricamente, igual o inferior a 15 %, p. ej., igual o inferior a 10 %, 8 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %, del sustrato de ADN bicatenario adecuado será degradado en tales condiciones. Preferentemente, no habrá degradación detectable de sustratos de ADN bicatenario en tales concentraciones.

En otras realizaciones más específicas, "sustancialmente específico para ADN monocatenario" también significa que

la exonucleasa de uso en la invención degrada ADN monocatenario pero a concentraciones de aproximadamente 0,1 U/μl en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM, existe una degradación escasa, insignificante o esencialmente nula de aproximadamente 5 pmol de un sustrato adecuado de ARN monocatenario (p. ej., un oligorribonucleótido monocatenario) en el transcurso de una incubación de 10 minutos. Expresado numéricamente, igual o inferior a 15 %, p. ej., igual o inferior a 10 %, 8 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %, del sustrato de ARN monocatenario adecuado será degradado en tales condiciones. Preferentemente, no habrá degradación detectable de sustratos de ARN monocatenario en tales concentraciones.

En ciertas realizaciones, "sustancialmente específico para ADN monocatenario" también significa que las exonucleasas de uso en la invención degradan ADN monocatenario pero a concentraciones de aproximadamente 0,1 a 1,0 U/μl (preferentemente 0,1 U/μl) en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM, existe una degradación escasa, insignificante o esencialmente nula contra sustratos de ácido nucleico de ADN no monocatenario en el transcurso de una incubación de 1 hora. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sustratos de ácido nucleico de ADN no monocatenario", en algunas realizaciones, se refiere tanto a ácidos nucleicos bicatenarios, p. ej., ADN bicatenario, como a ácido nucleico de ADN no monocatenario, aunque en realizaciones preferidas, la expresión se refiere solo a ácidos nucleicos bicatenarios, p. ej., ADN bicatenario. Expresado numéricamente, menos de 10 %, p. ej., menos de 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %, de (p. ej., aproximadamente 5 pmol de) un sustrato de ADN no monocatenario (es decir, ácido nucleico bicatenario y/o ácido nucleico de ADN no monocatenario) en tales condiciones será degradado. Preferentemente, no habrá degradación detectable de sustratos de ácido nucleico de ADN no monocatenario (es decir, ácido nucleico bicatenario y/o ácido nucleico de ADN no monocatenario) a tales concentraciones.

El experto en la materia será capaz de idear con facilidad un experimento para hacer una comparación de la actividad de la nucleasa relativa hacia ácido nucleico monocatenario y bicatenario. Por ejemplo, una exonucleasa sometida a ensayo puede incubarse con dos muestras de un producto de PCR marcado radiactivamente (p. ej., 5 pmol de dicho producto de PCT), uno en el que el producto ha sido desnaturalizado (es decir, monocatenario) y el otro en el que el producto no se desnaturaliza (es decir, bicatenario) en un tampón que consisten en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM en una concentración de 0,1 a 1,0 U/μl (preferentemente 0,1 U/μl) durante 10 minutos. La liberación de nucleótidos solubles en ácido se puede analizar como se describe en el Ejemplo 8 y 9.

Como alternativa, una exonucleasa sometida a ensayo puede incubarse con dos muestras de producto de PCR mencionadas anteriormente (p. ej., aproximadamente 5 pmol de dicho producto de PCT) en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM en una concentración de 0,1 a 1,0 U/μl (preferentemente 0,1 U/μl) durante una hora y luego los productos se separaron en un gel de electroforesis adecuado, p. ej., agarosa. La actividad contra ácido nucleico monocatenario y/o bicatenario será observable por la posición de las bandas en relación con los controles no tratados.

Otro enfoque mide el aumento de la fluorescencia de los oligonucleótidos marcados con el fluoróforo FAM (fluoresceína) en el extremo terminal 5' y con TAMRA en el extremo terminal 3'. La luz emitida de FAM se absorbe (extingue) por TAMRA cuando los dos marcadores están en proximidad. La escisión del oligonucleótido por la exonucleasa en el ensayo da lugar a la separación de FAM de TAMRA y a un aumento en la fluorescencia de FAM que se puede medir en un fluorímetro con longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm. Un sustrato bicatenario puede prepararse mezclando el oligonucleótido marcado con un segundo oligonucleótido que es complementario al oligonucleótido marcado. Por supuesto, pueden usarse de manera similar otros pares de fluoróforo adecuados. El ejemplo 7 describe un ensayo adecuado con mayor detalle.

Incluido dentro del término de ADN se encuentran modificaciones del mismo que retienen un esqueleto de desoxirribosfato unido a fosfodiéster. Los ejemplos comúnmente hallados de ADN monocatenario incluyen cebadores de oligodesoxirribonucleótidos y sondas de oligodesoxirribonucleótidos y aptámeros de ADN. Las etiquetas y marcadores de identificación nucleica también pueden ser ADN monocatenario. El ADN monocatenario también surge durante la transcripción inversa, y tras el desenrollamiento del dúplex durante la replicación del ADN y la transcripción de ADN. En las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y las reacciones de transcripción inversa, el ADN monocatenario puede surgir de cebadores parcialmente extendidos y de cualquier exceso de cebadores que no han sido extendidos e integrados en dúplex completamente sintetizados.

En otras realizaciones, las exonucleasas de uso en la invención no tienen sustancialmente actividad de exonucleasa. Por "sustancialmente sin actividad de endonucleasa" se quiere decir que, en concentraciones de 0,1 a 1,0 U/μl en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM, las exonucleasas de uso en la invención muestran una actividad de nucleasa escasa, insignificante o esencialmente nula contra ácido nucleico monocatenario circular o ácido nucleico bicatenario circular en el transcurso de una incubación de 1 hora. Expresado numéricamente, menos de 10 %, p. ej., menos de 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %, de (p. ej., aproximadamente 5 pmol de) un sustrato de ácido nucleico monocatenario o bicatenario será fragmentado (p. ej., en oligonucleótidos) en tales condiciones. Preferentemente, no será detectable ninguna actividad de endonucleasa a tales concentraciones.

Los fragmentos enzimáticamente activos y variante de SEQ ID NO: 1-5 muestran al menos 70 %, preferentemente, al menos 85 %, más preferentemente al menos 95 %, y lo más preferentemente al menos 99 % de la función enzimática

de las enzimas de las SEQ ID NO: 1-5, respectivamente. Como se discute en otra parte, la actividad de una exonucleasa puede evaluarse con facilidad usando técnicas rutinarias.

5 En el siguiente análisis, una referencia a una exonucleasa de uso en la invención es también una referencia a un fragmento enzimáticamente activo de la misma, a menos que el contexto indique lo contrario.

10 Por "sustancialmente inactivado de manera irreversible" se entiende que el calentamiento a la temperatura especificada para el tiempo especificado y en las condiciones de tampón especificadas, la enzima está al menos inactivada al 90 %, preferentemente 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % inactivada. El porcentaje de inactivación puede ser convenientemente estimado por medio de incubación de una muestra de ADN monocatenario (p. ej., marcado por FAM en 5') adecuadamente marcado (p. ej., una cebador de PCR convencional, por ejemplo, un cebador de ácido desoxirribonucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21 - GCTAACTACCACCTGATTAC) durante 30 minutos ya sea con una exonucleasa inactivada o con una exonucleasa no inactivada en un tampón adecuado (p. ej., Tris, HEPES, PBS) en un pH adecuado (p. ej., pH 7,5) a una temperatura adecuada (p. ej., 30 °C) y en presencia de Mg²⁺ (p. ej., 5 mM); separación de los productos de reacción en un gel adecuado (p. ej., gel de acrilamida/urea) por electroforesis y medición de las intensidades relativas de fluorescencia de las bandas de ADN bajo luz UV, p. ej., como se muestra en los Ejemplos 5 y 6. Los métodos alternativos podrían concebirse por el experto en la materia para medir las actividades relativas de exonucleasa inactivada y no inactivada, en particular, puede usarse un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM.

20 Incluso cuando la temperatura de la mezcla de reacción vuelve a temperatura ambiente, las exonucleasas de uso en la invención no recobran la actividad, es decir, no existe sustancialmente ninguna actividad residual; específicamente, menos de 10 %, preferentemente menos de 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 %, lo más preferentemente permanece ninguna actividad de exonucleasa detectable.

25 La inactivación sustancialmente irreversible se produce en un plazo de 10 minutos de incubación en las condiciones de tampón especificadas a una temperatura a 55 °C o aproximadamente a 55 °C, p. ej., 53 a 57 °C. Por ejemplo, en 7, 8 o 9 minutos de incubación a aproximadamente 55 °C. Como se muestra en el Ejemplo 5, en otras realizaciones, la exonucleasa de uso en la invención es sustancialmente inactivada de forma irreversible en las condiciones de tampón especificadas a una temperatura a 55 °C o aproximadamente a 55 °C, p. ej., 53 a 57 °C, en un plazo de 5 minutos, por ejemplo, en 2, 3 o 4 minutos. En otras realizaciones, la exonucleasa de uso en la invención es sustancialmente inactivada de forma irreversible en las condiciones de tampón especificadas a una temperatura a 50 °C o aproximadamente a 50 °C, p. ej., 48 a 53 °C, en un plazo de 10 minutos, por ejemplo, en 7, 8 o 9 minutos. En otras realizaciones, la exonucleasa de uso en la invención es sustancialmente inactivada de forma irreversible en las condiciones de tampón especificadas a una temperatura a 50 °C o aproximadamente a 50 °C, p. ej., 48 a 53 °C, en un plazo de 5 minutos, por ejemplo, en 2, 3 o 4 minutos. Las exonucleasas representadas por las SEC ID NO: 1 y 4 y variantes de las mismas son ejemplos de estas últimas realizaciones.

40 En otras realizaciones, la inactivación sustancialmente irreversible de la exonucleasa de uso en la invención se produce en un plazo de 1 minuto de incubación en las condiciones de tampón especificadas a una temperatura a 80 °C o aproximadamente a 80 °C, p. ej., 70 a 90 °C, 75 % a 85 °C, 78 a 82 °C o 79 a 81 °C. Por ejemplo, en una incubación de al menos aproximadamente 30, 40, 50 o 55 segundo a aproximadamente 80 °C.

45 Cuando esté en uso, la exonucleasa de uso en la invención puede ser sustancialmente inactivada de forma irreversible a temperaturas más bajas o durante periodos de tiempo más cortos dependiendo de las condiciones en las que se está usando la enzima, p. ej., a 55 °C durante 5 minutos o a 50 °C durante 5 a 15 minutos, p. ej., 10 a 15 minutos pero, de conformidad con la invención, el calentamiento durante 10 minutos a aproximadamente 55 °C en las condiciones de tampón especificadas ha de ser suficiente para inactivar sustancialmente de forma irreversible la enzima. Resultará evidente para un experto en la materia que los ajustes a uno de estos dos parámetros se pueden compensar mediante el ajuste del otro. Por ejemplo, el aumento de la temperatura de inactivación podría permitir que se reduzca la duración de la incubación. Por el contrario, el aumento de la duración de la incubación podría permitir que se use una temperatura de inactivación inferior. Por supuesto, como también resulta evidente para los expertos en la materia y como se muestra en los Ejemplos, cuando se usan exonucleasas en los métodos de la invención, las duraciones de incubación superiores a diez minutos pueden usarse y pueden usarse temperaturas de inactivación superiores a aproximadamente 55 °C, si es práctico, (p. ej., la inactivación podría tener lugar a 80 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 5 a 10 minutos, 55 °C durante 15 minutos o 50 °C durante 15 minutos). Sin embargo, para que se use en la invención, una exonucleasa ha de mostrar una inactivación sustancial si se incuba a una temperatura a 55 °C o aproximadamente 55 °C durante 10 minutos en las condiciones de tampón especificadas.

60 Las temperaturas y los tiempos de inactivación para una exonucleasa de uso en la invención deben evaluarse por medio de la incubación de la exonucleasa en tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM. La exonucleasa debe estar presente en aproximadamente 0,1 a 1,0 U/μl, preferentemente 0,1 a 1,5 U/μl, 0,1 a 5 U/μl o 0,1 U/μl a 10 U/μl.

65 En las realizaciones más preferidas, una exonucleasa de uso en la invención puede tener (o consistir en) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

Se desvela una exonucleasa de uso en la invención que tiene (o que consiste en) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. Ser definido completamente por una secuencia de aminoácidos significa que las características funcionales particulares descritas anteriormente no se aplican necesariamente a este aspecto. Sin embargo, como se muestra en los Ejemplos, cada uno de estas exonucleasas específicas encuentra utilidad en los métodos de la invención descritos en la presente memoria.

Las exonucleasas de uso en la invención pueden ser proporcionarse en una forma modificada, p. ej., como una proteína de fusión con un motivo de aminoácidos útil en un proceso de aislamiento, solubilización y/o purificación o identificación de las exonucleasas. Tales motivos de aminoácidos (conocidos como marcadores de proteína) incluyen, entre otros, marcadores de polihistidina (His). Ejemplos de exonucleasas marcadas con polihistidina de uso en la invención se enumeran en las SEQ ID NO: 11 a 15.

Modificaciones adicionales incluye la introducción de pequeños grupos químicos a los átomos disponibles del polipéptido, p. ej., grupos protectores para los extremos terminales N y C o los grupos R de residuos de aminoácidos no esenciales dentro del polipéptido. En otras realizaciones, las exonucleasas de uso en la invención pueden ser proporcionadas inmovilizadas en un soporte sólido, p. ej., un soporte sólido seleccionado entre partículas, microgránulos, perlas, láminas, geles, filtros, membranas, fibras, capilares, microplacas, tiras de microtítulos, portaobjetos, tubos, placas o pocillos, etc. Preferentemente, el soporte es magnético (preferentemente paramagnético o superparamagnético), p. ej., partículas magnéticas, por ejemplo, perlas y microgránulos magnéticos. Aún otras formas modificadas incluyen dímeros o trímeros de las exonucleasas de uso en la invención. Tales entidades pueden ser homogéneas o heterogéneas en su composición monomérica.

También se desvelan moléculas de ácido nucleico que codifican las exonucleasas de uso en la invención y fragmentos enzimáticos de las mismas. Las secuencias nucleotídicas correspondientes a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 5 se desvelan en las SEQ ID NO: 6 a 10, respectivamente, y los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender estas secuencias de nucleótidos. Las secuencias nucleotídicas correspondientes a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 a 15 se desvelan en las SEQ ID NO: 16 a 20, respectivamente, y los ácidos nucleicos pueden comprender estas secuencias de nucleótidos. La degeneración del código genético significa que cada una de las SEQ ID NO: 6 a 10 y 16 a 20 son cada una solo una de las muchas secuencias de nucleótidos posibles que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 5 y 11 a 15, respectivamente. Por consiguiente, se desvelan moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de las SEQ ID NO: 6 a 10 y 16 a 20. Las moléculas de ácido nucleicos pueden ser vectores de ácido nucleico, p. ej., vectores de clonación o vectores de expresión. Los vectores preferidos son plásmidos compatibles con las células bacterianas y/o de levadura.

Las actividades enzimáticas y las características de inactivación de las exonucleasas de uso en la invención hacen que tales enzimas sean especialmente adecuadas para la eliminación de ADN monocatenario a partir de muestras que contienen macromoléculas biológicas, en particular, los productos de una amplificación de ácido nucleico o reacciones de transcripción inversa, p. ej., ADN, ARN bicatenario, y dúplex de ADN:ARN.

Así, En un aspecto adicional se proporciona un método de eliminación de ADN monocatenario de una muestra, preferentemente una muestra de macromoléculas biológicas, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con una exonucleasa como se ha definido anteriormente.

Las exonucleasas de uso en la invención se usan de este modo para degradar ADN monocatenario presente en la muestra. En particular, el método implica poner en contacto la muestra con una exonucleasa de uso en la invención en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción del ADN monocatenario presente en la muestra y luego calentar la muestra para inactivar dicha exonucleasa. Estas etapas de digestión e inactivación serán normalmente incubaciones y se describen en la presente memoria, en particular, en los Ejemplos. Las condiciones adecuadas de incubación para lograr la digestión del ADN monocatenario en una muestra son conocidas en la técnica y pueden comprender convenientemente una incubación de 10 a 45 °C, p. ej., a o aproximadamente 20 a 40 ° o 30 °C durante 1 a 30 minutos, p. ej., 1 a 20 minutos, 1 a 15 minutos o 1 a 10 minutos, preferentemente alrededor de 5 minutos o menos. Si se usa una temperatura en el extremo superior de estos intervalos, la duración de la incubación puede estar en el extremo inferior de estos intervalos, y viceversa. Las condiciones de inactivación pueden estar basadas en la discusión de tales parámetros dados anteriormente.

Por "eliminación de ADN monocatenario" se entiende que la cantidad de ADN monocatenario en la muestra se reduce en cierta medida. Se abarcan realizaciones en las que se reduce la cantidad de ADN monocatenario por debajo de los niveles detectables, así como realizaciones en las que se reduce la cantidad de ADN monocatenario a una cantidad más pequeña pero aún detectable. Preferentemente, la cantidad de ADN monocatenario se reduce lo suficiente como para mejorar la calidad de la muestra tal como se define por el contexto relevante, p. ej., su uso en una reacción de análisis de la secuencia de ácido nucleico. Expresado numéricamente, la cantidad de ADN monocatenario en una muestra puede ser reducida en al menos 10 %, p. ej., en al menos, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % o en 100 %. En términos prácticos, para eliminar ADN monocatenario de una muestra, o para reducir la cantidad de ADN monocatenario en una muestra, de conformidad con la invención, se degrada al menos

una porción del ADN monocatenario presente en una muestra. La expresión "al menos una porción" debe interpretarse de acuerdo con lo anterior.

5 En una realización preferida, la muestra es una preparación que contiene un ácido nucleico de interés (p. ej., ADN, ARN, APN), p. ej., un ácido nucleico bicatenario o un dúplex de ADN:ARN; una proteína de interés, por ejemplo una proteína de interés producida de forma recombinante, p. ej., una enzima; un polímero de carbohidratos; o un lípido. Alternativamente, la proteína de interés puede ser un analito u otra proteína que se desea purificar a partir de un material de partida. La proteína de interés puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La proteína (p. ej., anticuerpo) podría ser útil en métodos de diagnóstico o terapéuticos. Así, el método descrito anteriormente se puede
10 usar con el fin de asegurar que la proteína de diagnóstico o terapéutica está libre de contaminación de ADN monocatenario para que así sea seguro administrarla. La proteína de interés puede ser una proteína de unión a ADN u otra proteína que se asocia con el ácido nucleico, particularmente, ADN monocatenario en solución. Por consiguiente, la preparación se puede derivar de un lisado celular o muestra tisular o fluido corporal y/o puede ser el producto de una amplificación de ácido nucleico o una reacción de transcripción inversa. El método de la invención
15 puede ser considerado, por lo tanto, como que abarca un método para refinar o enriquecer una muestra que comprende ADN, ARN bicatenario, y/o dúplex de ADN:ARN por eliminación de ADN monocatenario. Dicho método comprendería poner en contacto la muestra con una exonucleasa como se ha definido anteriormente y luego calentar la muestra tratada con exonucleasa para inactivar dicha exonucleasa.

20 En realizaciones preferidas, la muestra es el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto de una reacción de transcripción inversa y, de este modo, la invención proporciona un método de eliminación de ADN monocatenario a partir del producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto de una reacción de transcripción inversa, comprendiendo dicho método el uso de una exonucleasa como se ha definido anteriormente. El método comprende poner en contacto el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto
25 de una reacción de transcripción inversa con una exonucleasa como se ha definido anteriormente y luego calentar la muestra tratada con exonucleasa para inactivar dicha exonucleasa.

Las exonucleasas de uso en la invención son por lo tanto usadas para degradar ADN monocatenario presente en el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto de una reacción de transcripción inversa.
30 En particular, el método implica poner en contacto el producto de amplificación de ácido nucleico o el producto de reacción de transcripción inversa con una exonucleasa de uso en la invención en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción del ADN monocatenario presente en el mismo y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa. Las características de las etapas de digestión e inactivación se han descrito anteriormente.

35 La expresión "reacción de amplificación de ácido nucleico" se refiere a cualquier medio *in vitro* para aumentar el número de copias de una secuencia diana de ácido nucleico o su secuencia complementaria. Preferentemente, los métodos de amplificación implicarán "ciclos térmicos", es decir, que implica ciclos a temperatura elevada. Los métodos de amplificación incluyen, aunque no de forma limitativa, PCR y modificaciones de la misma, 3SR, SDA, LAR o LCR y LAMP y modificaciones de las mismas. PCR y LCR y sus modificaciones son métodos de ciclo térmico. Los métodos
40 pueden resultar en un incremento lineal o exponencial en el número de copias de la secuencia diana. "Modificaciones" abarcan, aunque no de forma limitativa, amplificación en tiempo real, amplificación cuantitativa y semicuantitativa, amplificación competitiva, PCR de inicio caliente, etcétera. La transcripción inversa puede combinarse con otras reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, según proceda.

45 Preferentemente, el método de amplificación de ácido nucleico es un método basado en el uso de cebadores de oligonucleótidos como iniciadores de la síntesis de ácido nucleico, p. ej., las PCR, LAR, SDA, LAMP y NASBA.

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

"Transcripción inversa" es un proceso en el que se transcribe un molde de ARN monocatenario en un ADN monocatenario complementario (ADNc). Estas cadenas de ácido nucleico existen como un dúplex hasta que se aplican condiciones de desnaturalización. El ADN monocatenario también puede ser usado como molde para formar ADNc bicatenario en la llamada etapa de síntesis de ADNc de segunda cadena. Algunas enzimas polimerasa de ácido nucleico son capaces de producir la primera cadena de ADNc y sintetizar la segunda cadena para formar ADNc bicatenario para solo una de las dos etapas.
60

Un "producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico" es considerado, por lo tanto, para comprender esencialmente todos los componentes obtenidos directamente de la etapa de amplificación final de la reacción en cuestión. Otros componentes pueden ser añadidos o algunos de los componentes pueden someterse a cierta modificación o procesamiento, pero esencialmente ninguno de los componentes, o al menos ninguno de los
65 componentes de ácido nucleico, se eliminarán. Preferentemente, el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico es el producto directo de la etapa de amplificación final; sin embargo, también podría ser preferible que

el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico se someta a un tratamiento para llevar a cabo la desfosforilación de cualquier NTP no incorporado, p. ej., un tratamiento con una fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, por ejemplo, la fosfatasa alcalina de gamba lábil al calor (SAP, por sus siglas en inglés), antes del tratamiento con las exonucleasas de uso en la invención. Las referencias en la presente memoria a NTPs incluyen específicamente referencias a dNTPs a menos que el contexto indique lo contrario. En otras realizaciones, la desfosforilación de NTP puede tener lugar después del tratamiento con las exonucleasas de uso en la invención, o al mismo tiempo. Un SAP recombinante ventajoso está disponible en ArcticZymes™ AS.

Por consiguiente, los métodos definidos anteriormente de eliminación de ADN monocatenario a partir del producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto de una reacción de transcripción inversa puede comprender además el uso de una fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, para desfosforilar cualquier NTP no incorporado antes de, al mismo tiempo que, o después del uso de la exonucleasa para eliminar ADN monocatenario, es decir, antes de, al mismo tiempo que, o después de la etapa de poner en contacto el producto de la reacción de amplificación o transcripción inversa con la exonucleasa. En particular, usando una fosfatasa alcalina en estos métodos implica poner en contacto la fosfatasa alcalina con el producto de la reacción de amplificación/transcripción inversa antes de, al mismo tiempo que, o después de poner en contacto dicho producto con la exonucleasa de uso en la invención.

Preferentemente, cualquier tratamiento con fosfatasa alcalina puede preceder a cualquier etapa de inactivación por calor. En realizaciones en las que no, se puede usar una etapa de inactivación por calor adicional.

En términos estructurales, un producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico según la invención comprenderá el ácido nucleico y NTPs de molde y normalmente además una polimerasa y al menos un cebador de oligonucleótido, que pueden estar parcialmente extendidos. También, normalmente, la mayor parte del producto se compone de un tampón de amplificación de ácido nucleico adecuado, p. ej., un tampón como ejemplifica la presente memoria. Los productos preferidos de reacciones de amplificación de ácido nucleico comprenden todos estos elementos.

En estas realizaciones, los tratamientos de la invención eliminan (es decir, degradan), según sea apropiado, un exceso de cebadores de ADN no extendido, cebadores de ADN parcialmente extendido, molde de ADN monocatenario, amplicones de ADN monocatenario, amplicones de ADN desnaturalizado, etcétera.

Un "producto de una reacción de transcripción inversa" debe interpretarse según la definición de un producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico, teniendo presente que una reacción de transcripción inversa podría tener solo una etapa de polimerización de ácido nucleico dependiente de ARN y, opcionalmente, puede tener una o más etapas de síntesis de ADNc de segunda cadena. Preferentemente, el producto de una reacción de transcripción inversa al que se aplica la exonucleasa de uso en la invención es un producto que comprende dúplex de ADNc/ARN y/o ADNc bicatenario.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo dicho método una etapa posterior a la etapa de amplificación final de poner en contacto el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico con la exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en la presente memoria en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en el producto y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma. Preferentemente, el método comprende poner en contacto el producto directo de una etapa de amplificación final, con una exonucleasa como se define en la presente memoria. Dicho método puede comprender además una etapa, posterior a la etapa de amplificación final, que consiste en usar una fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, para desfosforilar cualquier NTP no incorporado en el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico antes de, al mismo tiempo que, o después del uso de la exonucleasa para eliminar ADN monocatenario, es decir, antes de, al mismo tiempo que, o después de la etapa de poner en contacto el producto de la reacción de amplificación con la exonucleasa. En particular, usando una fosfatasa alcalina en estos métodos implica poner en contacto la fosfatasa alcalina con el producto de la reacción de amplificación antes de, al mismo tiempo que, o después de poner en contacto dicho producto con la exonucleasa de uso en la invención.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de transcripción inversa, comprendiendo dicho método una etapa posterior a la etapa de transcripción inversa final, y/o, si está presente, la etapa de síntesis final de ADNc de segunda cadena, que consiste en poner en contacto el producto de la reacción de transcripción inversa con la exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en la presente memoria en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en el producto y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma. Preferentemente, el método comprende poner en contacto el producto directo de la etapa de transcripción inversa final, y/o, si está presente, el producto directo de la etapa de síntesis de ADNc de segunda cadena final, con una exonucleasa como se define en la presente memoria. Preferentemente, dichos productos serán productos que comprenden dúplex de ADNc/ARN y/o ADNc bicatenario. Dicho método puede comprender además una etapa, posterior a la etapa de transcripción inversa final, y/o, si está presente, la etapa de síntesis final de ADNc de segunda cadena, que consiste en usar una fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, para

desfosforilar cualquier NTP no incorporado en el producto de la reacción de transcripción inversa antes de, al mismo tiempo que, o después del uso de la exonucleasa para eliminar ADN monocatenario, es decir, antes de, al mismo tiempo que, o después de la etapa de poner en contacto el producto de la reacción de transcripción inversa con la exonucleasa. En particular, usando una fosfatasa alcalina en estos métodos implica poner en contacto la fosfatasa alcalina con el producto de la reacción de transcripción inversa antes de, al mismo tiempo que, o después de poner en contacto dicho producto con la exonucleasa de uso en la invención.

Las exonucleasas de uso en la invención son por lo tanto usadas para degradar ADN monocatenario presente en el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto de una reacción de transcripción inversa. Los métodos implican poner en contacto el producto de amplificación de ácido nucleico o el producto de reacción de transcripción inversa con una exonucleasa de uso en la invención en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción del ADN monocatenario presente en el mismo y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa. Las características de las etapas de digestión e inactivación se han descrito anteriormente. Preferentemente, cualquier tratamiento con fosfatasa alcalina puede preceder a la etapa de inactivación por calor. En realizaciones en las que no, se puede usar una etapa de inactivación por calor adicional.

Es habitual combinar transcripción inversa con una o más reacciones de amplificación de ácido nucleico. También es habitual combinar una pluralidad de reacciones de amplificación de ácido nucleico en un único protocolo de múltiples etapas. Resultará inmediatamente evidente que cada parte de estos protocolos de múltiples etapas pueda considerarse un método de amplificación de ácido nucleico o un método de transcripción inversa de la invención por derecho propio y, por ende, la exonucleasa de uso en la invención puede ser usada según la invención en cualquiera o todas las partes de estos protocolos de múltiples etapas.

Se desvela un método de optimización de análisis de la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicho método el uso de una exonucleasa, como se define en la presente memoria, para eliminar ADN monocatenario de la muestra a analizar. El método comprenderá normalmente poner en contacto la muestra con una exonucleasa definida en la presente memoria.

Preferentemente, en la presente divulgación, la muestra es el producto de una reacción de amplificación o el producto de una reacción de transcripción inversa, p. ej., como se ha definido anteriormente, pero se pueden usar otras muestras, p. ej., las preparadas directamente a partir de materiales biológicos o que contienen materiales biológicos, p. ej., microorganismos, fluidos corporales, células eucariotas, cultivos, tumores y tejidos. Preferentemente, la muestra será al menos parcialmente preparaciones de ácido nucleico purificadas de las muestras antes mencionadas, p. ej., preparaciones de ADN y ARN.

La expresión "optimización" abarca una mejora en la exactitud y/o sensibilidad del análisis de la secuencia de ácidos nucleicos (p. ej., los productos de las reacciones de amplificación de ácido nucleico o transcripción inversa). Esta mejora es, al menos en parte, resultado de la eliminación de ADN monocatenario que pueden interferir y/o competir con las reacciones de análisis de secuencias, reduciendo su eficacia contra el molde diana, y/o que son a su vez secuenciadas y así contribuyen al ruido de fondo en el sistema, con lo que el análisis de las señales emitidas es menos sensible.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método de análisis de secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicho método una etapa de preparación de la muestra antes de la(s) etapa(s) de análisis, comprendiendo dicha etapa de preparación poner en contacto la muestra a analizar con la exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en la presente memoria en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en la muestra y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma.

En estos últimos aspectos, cuando la muestra es un producto de una reacción de amplificación o el producto de una reacción de transcripción inversa, la muestra también puede someterse a un tratamiento con fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, para desfosforilar cualquier NTP no incorporado. Por consiguiente, el método definido anteriormente del análisis de la secuencia de ácido nucleico puede comprender una etapa de preparación de la muestra adicional del uso de una fosfatasa alcalina para desfosforilar cualquier NTP incorporado antes de, al mismo tiempo que, o después del uso de la exonucleasa para eliminar ADN monocatenario, es decir, antes de, al mismo tiempo que, o después de la etapa de poner en contacto la muestra a analizar con la exonucleasa. En particular, usando una fosfatasa alcalina en estos métodos implica poner en contacto la fosfatasa alcalina con la muestra a analizar antes de, al mismo tiempo que, o después de poner en contacto dicho producto con la exonucleasa de uso en la invención.

En estos últimos aspectos, las exonucleasas de uso en la invención se usan de este modo para degradar ADN monocatenario presente en la muestra a analizar, p. ej., las muestras analizadas anteriormente. En particular, el método implica poner en contacto la muestra con una exonucleasa de uso en la invención en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción del ADN monocatenario presente en misma y calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa. Las características de las etapas de digestión e inactivación se han descrito anteriormente. Preferentemente, cualquier tratamiento con fosfatasa alcalina puede preceder a la etapa de inactivación por calor. En

realizaciones en las que no, se puede usar una etapa de inactivación por calor adicional.

Preferentemente, en estos últimos aspectos, el análisis de la secuencia de ácido nucleico es una técnica de secuenciación, p. ej., el método de secuenciación de dideoxinucleótidos de Sanger o un enfoque de secuenciación de "siguiente generación" o "segunda generación" (por ejemplo, los relacionados con la pirosecuenciación, secuenciación terminadora reversible, secuenciación con sonda escindible por ligamiento, secuenciación con sonda no escindible por ligamiento, nanobolas de ADN, secuenciación de ADN, y secuencia de una sola molécula en tiempo real) o un enfoque basado en una sonda de hibridación de oligonucleótidos en el que la presencia de una secuencia de nucleótidos diana es confirmada al detectar un evento de hibridación específico entre una sonda y su diana.

El análisis de la secuencia de ácido nucleico puede proporcionar información útil en la genotipificación de un organismo, p. ej., para aplicaciones de clasificación, identificación, cuantificación, pronóstico, diagnóstico y/o forenses, o útil en el perfilado del transcriptoma de una célula o grupo de células, p. ej., para aplicaciones de pronóstico, diagnóstico y/o de investigación. Se desvela el uso de las exonucleasas definidas en la presente memoria en los métodos descritos aquí para tales fines.

Se desvela el uso de una exonucleasa tal como se define en la presente memoria para eliminar ADN monocatenario de una muestra, y más específicamente en los métodos descritos en la presente memoria.

Cuando sea adecuado, las exonucleasas de uso en la invención pueden ser aisladas de una forma natural, p. ej., aisladas de extractos de los organismos descritos anteriormente, o producidas de forma recombinante en una célula huésped y aisladas y purificadas de los mismos. Las exonucleasas de uso en la invención pueden ser por tanto enzimas recombinantes, en particular, enzimas recombinantes aisladas. En ciertas realizaciones, la exonucleasa es producida mediante técnicas recombinantes en una célula huésped que no es, o no procede de, un organismo que es el mismo que aquel en el que se encuentra de forma natural la exonucleasa, es decir, una célula huésped heteróloga. Como alternativa, un sistema de expresión libre de células se puede usarse para la producción de la exonucleasa. Estos enfoques pueden dar lugar a un patrón de glicosilación alterado.

Se desvela un método de aislamiento y purificación de una exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se describe en la presente memoria. El método comprende el cultivo de células en el que se expresa la exonucleasa y la separación posterior de la exonucleasa de dichas células y/o medios en los que se han cultivado dichas células. Preferentemente, el método comprende expresar dicha exonucleasa en una célula huésped heteróloga adecuada (p. ej., *E. coli*, *Bacillus* y *Pichia pastoris*), y separar posteriormente la exonucleasa de dichas células huésped y/o de los medios en los que se han cultivado dichas células. La expresión de dicha exonucleasa se puede lograr por medio de la incorporación en una célula huésped adecuada de un vector de expresión que codifica dicha nucleasa, p. ej., un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 5 u 11 a 15, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 6 a 10 o 16 a 20. Se desvelan las células huésped que comprenden estos vectores y moléculas de ácido nucleico.

La enzima exonucleasa puede ser separada, o aislada, de las células huésped/medios de cultivo usando cualquiera de las técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica y descritas ampliamente en la literatura o cualquier combinación de las mismas. Tales técnicas pueden incluir, por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, diálisis, diversas técnicas cromatográficas, p. ej., filtración por gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, electroforesis, centrifugación, etc. Como se ha analizado anteriormente, la exonucleasa de uso en la invención puede ser modificada para llevar motivos de aminoácidos u otros marcadores de proteínas o sin proteínas, p. ej., marcadores de polihistidina, para ayudar en el aislamiento, solubilización y/o purificación o identificación. Ejemplos de exonucleasas marcadas con polihistidina de uso en la invención se enumeran en las SEQ ID NO: 11 a 15.

Del mismo modo, un extracto de células huésped también se puede preparar usando técnicas bien conocidas en la técnica, p. ej., homogeneización, congelación-descongelación, etc., y a partir de este extracto, la exonucleasa de uso en la invención se puede purificar.

El almacenamiento en congelador de la exonucleasa de uso en la invención puede conseguirse convenientemente con un tampón de almacenamiento de Tris/HCl 5 mM, pH 7,5 (a 25 °C), NaCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,25 mM, glicerol al 50 %, aunque se pueden usar otros tampones.

Asimismo se desvelan kits que comprenden al menos una exonucleasa de uso de la invención o un ácido nucleico que codifica una exonucleasa de uso en la invención. Los kits también pueden contener parte o la totalidad de los reactivos necesarios, tampones, enzimas, etc., para llevar a cabo las reacciones de amplificación de ácido nucleico y/o transcripción inversa y/o análisis de secuencia. Más en particular, los kits pueden contener nucleótidos trifosfato (incluyendo dNTPaS para SDA), cebadores oligonucleotídicos, sondas de oligonucleótidos, transcriptasas inversas, ADN polimerasas, preferentemente una polimerasa termoestable tal como polimerasa *Taq* o polimerasa *Bst* (y versiones de inicio caliente de las mismas) o, en el caso de LAR, una ADN ligasa (preferentemente una ADN ligasa termoestable, tal como Ampligase® o la desvelada en el documento US6280998 que se aísla de *Pyrococcus furiosus*) una fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, (p. ej., SAP), o una enzima de restricción

(preferentemente una enzima de restricción termoestable, tal como BsoB1). Los kits que comprenden una exonucleasa de uso de la invención o un ácido y una fosfatasa alcalina, preferentemente, una fosfatasa alcalina termolábil, (p. ej., SAP), p. ej., cualquiera de las divulgadas en la presente memoria son dignas de mencionar.

5 También se desvelan composiciones que comprenden una exonucleasa de uso en la invención y uno o más de los reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación de ácido nucleico y/o transcripción inversa y/o análisis de secuencia y métodos, p. ej., los componentes descritos anteriormente. Normalmente, tales composiciones serán acuosas y tamponadas con un tampón convencional, tal como Tris, HEPES, etc. También se desvelan composiciones que comprenden una exonucleasa de uso en la invención en un tampón.

10 La invención se describirá ahora a modo de Ejemplos no limitativos con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una exonucleasa de *Shewanella* sp. (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, respectivamente).

15 La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una exonucleasa de *Halomonas* sp. (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7, respectivamente).

La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una exonucleasa de *Vibrio wodanis* (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, respectivamente).

20 La Figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una exonucleasa de *Psychromonas* sp. (SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 9, respectivamente).

La Figura 5 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una exonucleasa de *Moritella viscosa* (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10, respectivamente).

25 La Figura 6 muestra un alineamiento de SEQ ID NOS: 1-5 con la secuencia de aminoácidos de una exonucleasa I de *E. coli* (SEQ ID NO: 22) generado con una herramienta de alineamiento múltiple de ClustalW. La secuencia de consenso se muestra en la parte inferior. *, residuos idénticos en todas las secuencias; residuos altamente conservados entre las secuencias; residuos escasamente conservados entre las secuencias.

La Figura 7 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una versión marcada con His de una exonucleasa de *Shewanella* (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 16, respectivamente).

30 La Figura 8 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una versión marcada con His de una exonucleasa de *Halomonas* (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 17, respectivamente).

La Figura 9 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una versión marcada con His de una exonucleasa de *Vibrio wodanis* (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 18, respectivamente).

35 La Figura 10 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una versión marcada con His de una exonucleasa de *Psychromonas* (SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 19, respectivamente).

La Figura 11 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de una versión marcada con His de una exonucleasa de *Moritella viscosa* (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 20, respectivamente).

40 La Figura 12 muestra imágenes de un número de geles de poliacrilamida en los que los productos de una variedad de reacciones entre un oligonucleótido de ADN monocatenario y una variedad de exonucleasas lábiles al calor (LC) se han separado, indicando de este modo la actividad de la enzima contra el ADN monocatenario. Las condiciones de tampón como se describen en el Ejemplo 2. (-) Cont - control negativo. Figura 12a: Actividad de Exol-LC (Ha) en diferentes temperaturas (20 a 37 °C) en diferentes intervalos de tiempo (1 a 10 minutos). Diferentes factores de dilución dependientes del tiempo de incubación (4x durante 1 a 5 minutos y 10x durante 10 minutos). Figura 12b: Actividad de Exol-LC (Ps) en diferentes temperaturas (20 a 37 °C) en diferentes intervalos de tiempo (1 a 10 minutos). Diferentes factores de dilución dependientes del tiempo de incubación (3x durante 1 minuto, 8x durante 5 minutos y 12x durante 10 minutos). Figura 12c: Actividad de Exol-LC (Sh) en diferentes temperaturas (20 a 37 °C) en diferentes intervalos de tiempo (1 a 10 minutos). Diferentes factores de dilución dependientes del tiempo de incubación (4x durante 1 minuto y 5 minutos y 10x durante 10 minutos). Figura 12d: Actividad de Exol-LC (Mv) en diferentes temperaturas (20 a 37 °C) en diferentes intervalos de tiempo (1 a 10 minutos). Diferentes factores de dilución dependientes del tiempo de incubación (1 durante 1 minuto y 5 minutos y 2x durante 10 minutos).

50 La Figura 13 muestra una imagen de un gel de poliacrilamida en el que los productos de una variedad de reacciones entre un oligonucleótido de ADN monocatenario y una variedad de exonucleasas tratadas con calor se han separado, indicando de este modo la actividad de la enzima contra el ADN monocatenario. Las condiciones de tampón como se describen en el Ejemplo 3. (-) Cont - control negativo. Cuatro enzimas de Exol de *E. coli* comercialmente disponibles (Exol A-D), un kit de limpieza por PCR enzimática comercialmente disponible y una Exol-LC (Sh) se compararon en términos de facilidad de inactivación térmica. Las muestras se incubaron durante 1 min a 80 °C antes de la adición de sustrato y la actividad de incubación residual.

55 La Figura 14 muestra resultados de la secuenciación representativa de las reacciones de secuenciación del Ejemplo 4. Figura 14a: una reacción basada en tampón para PCR de GoTaq-ExoSAP-IT corresponde con el protocolo de 30 minutos descrito en el Ejemplo 4 y Exol-LC (Sh)/SAP corresponde con el protocolo de 5 minutos describe en el Ejemplo 4. Figura 14b: al igual que la Figura 14a, respectivamente, si bien se usa un tampón para PCR TEMPase Extra en lugar de GoTaq. Figura 14c: al igual que la Figura 14a, aunque ExoSAP-IT y Exol-LC (Sh)/SAP corresponde con el protocolo de 5 min descrito en el Ejemplo 4.

65 La Figura 15 muestra imágenes de un número de geles de poliacrilamida en los que los productos de una variedad de reacciones entre un oligonucleótido de ADN monocatenario y Exol-LC de uso en la invención se han separado, indicando de este modo la actividad residual de la enzima tras el tratamiento térmico contra ADN monocatenario.

Condiciones de tampón como se describen en el Ejemplo 5. 15a: Exol-LC (Ha); 15b: Exol-LC (Sh); 15c: Exol-LC (Ps); 15d: Exol-LC (Mv); 15e: Exol-LC (Vw). (-) Cont - control negativo. Las muestras se incubaron durante 5 minutos, 10 minutos o 15 minutos a temperaturas diferentes temperaturas (40 °C-60 °C) antes de la adición del sustrato y la actividad de incubación residual, que se realizó a 30 °C durante 30 minutos, y luego durante 2 minutos a 95 °C.

La Figura 16 muestra imágenes de un número de geles de poliacrilamida en los que los productos de una variedad de reacciones entre un oligonucleótido de ADN monocatenario y Exol-LC de uso en la invención se han separado, indicando de este modo las actividades de Exol de ensayo contra ADN monocatenario al aumentar la dilución. Condiciones de tampón como se describen en el Ejemplo 6. 16a: Exol-LC (Ha); 16b: Exol-LC (Sh); 16c: Exol-LC (Ps); 16d: Exol-LC (Mv); 16e: Exol-LC (Vw). (-) Cont - control negativo. 100 % - enzima no diluida, 10 % - enzima diluida 10 veces, 1 % - enzima diluida 100 veces, 0,1 % - enzima diluida 1.000 veces, 0,01 % - enzima diluida 10.000 veces. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 30 °C, y luego durante 2 minutos a 95 °C.

La Figura 17 muestra la direccionalidad en 3' a 5' de Exol-LC (Ha, Ps, Sh, Vw, Mv) así como para Exol de *E. coli*. Condiciones de ensayo como se describen en el Ejemplo 11. Cuando FAM se marcó en el extremo 5', una escalera de bandas de producto intermedio leves e intensas parciales se observaron al indicar la Exol que degrada el sustrato desde el extremo 3'. Cuando el oligo fue marcado con FAM en el extremo 3', el fluoróforo se cortó inmediatamente, generando solo el monómero FAM en 3'. (-) Cont - control negativo. Exol - Exol de *E. coli*.

La Figura 18 muestra la estructura cristalina de Exol-LC (Mv) en un complejo con ADNmc (dT13) a una resolución de 2,5 Å. Configuración experimental como se describe en el Ejemplo 12. Residuos de sitio activo Asp23, Glu25 y Asp194 se indican como palos. En la estructura tridimensional de la Exol-LC (Mv), el extremo 3' de dT13 se ubica claramente en el sitio activo de la enzima.

La Figura 19 muestra un gel de poliacrilamida en el que la actividad e inactivación de Exol-LC (Ps, Sh, Vw, Mv) y Exol de *E. coli* se compararon. Condiciones de tampón y configuración de reacción como se describen en el Ejemplo 12. Todas las enzimas se sometieron a ensayo para una actividad a 30 °C durante 15 minutos, así como la actividad residual en las mismas condiciones de tiempo y temperatura tras la incubación a 80 °C durante 1 minuto. Para imitar un ensayo de limpieza post-PCR, la reacción se realizó en un tampón de post-PCR.

La Figura 20 muestra un gel de poliacrilamida en el que la actividad e inactivación de Exol-LC (Sh) y Exol de *E. coli* se compararon. Condiciones de tampón y configuración de reacción como se describen en el Ejemplo 12. Todas las enzimas se incubaron a 80 °C durante 1, 5, 10 o 20 minutos antes de la adición de sustrato e incubación a 30 °C durante 15 minutos. Para imitar un ensayo de limpieza post-PCR, la reacción se realizó en un tampón de post-PCR. No se detectó actividad residual alguna en Exol-LC (Sh) después de 1 min de incubación a 80 °C, mientras que se observó actividad residual sustancial con dos Exol de *E. coli* después de 5 minutos, e incluso después de 20 minutos de incubación a 80 °C en el caso de Exol A.

La Figura 21 muestra resultados de la secuenciación representativa de las reacciones de secuenciación del Ejemplo 14 (A: Control negativo; B: ExoSAP-IT; C: Exol-LC (Sh)/SAP; D: Exol-LC (Ps)/SAP; E: Exol-LC (Mw)/SAP; F: Exol-LC (Vw)/SAP. Todas las imágenes muestran los cromatogramas resultantes tras la adición del exceso de cebador inverso antes de la limpieza de PCR. Todos los resultados de secuenciación se basan en el tampón para PCR de GoTaq. ExoSAP-IT corresponde con el protocolo de 30 minutos, mientras que Exol-LC/SAP corresponde con el protocolo de 5 minutos, ambos descritos en el Ejemplo 14.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Clonación, expresión recombinante y purificación parcial de exonucleasas

El gen de la *exodesoxirribonucleasa I (exol) sbcB* de ADNg de *Moritella viscosa* (Exol-LC (Mw)), *Vibrio wodanis* (Exol-LC (Vw)), *Halomonas* (Exol-LC (Ha)), *Psychromonas* (Exol-LC (Ps)) y *Shewanella* (Exol-LC (Sh)) se clonó por clonación por PCR de extensión solapante (Bryksin y Matsumura, 2010, Biotechniques, 48 (6), 463 - 465) con un marcador con His en el extremo C-terminal insertando el gen clonado en el vector de expresión pTrc99A para la expresión en TOP10 de *E. coli*. Los cebadores usados se enumeran en la Tabla 1. El material de origen genético se obtuvo de bacterias aisladas de las aguas próximas a las costas noruegas.

Tabla 1: Cebadores usados para la clonación de genes de Exol.

Letras en negrita, secuencia específica de pTrc99A; letras en mayúscula, secuencia específica del gen; letras en minúscula, espaciador y secuencia de etiqueta.		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
directo de Mv	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGG ATAACAATTCGAACAAAACAGCAACAG	23
inverso de Mv	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCC tcagtgatggt gatggtgatg-gcctgcagaTGCGCCAATTATTTTTTGACCATAAAGG	24

(continuación)

Letras en negrita, secuencia específica de pTrc99A; letras en mayúscula, secuencia específica del gen; letras en minúscula, espaciador y secuencia de etiqueta.		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
directo de Vw	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGCC GCAGGATAACGCACCAAG	25
inverso de Vw	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCC tcagtgatggtga tggtgatggcctgcagaTGATACTAACTGTTGTACGTAATTATAAACG GCGC	26
directo de Ha	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGGCA TCACCCAATGCTGCC	27
inverso de Ha	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCC tcagtgatggtga tggtgatggcctgcagaGGCATCAAATGCCTGGGCCG	28
directo de Ps	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGAAT CAAGAATCCCAAGCCTTCTTTGG	29
inverso de Ps	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCC tcagtgatggtga tggtgatggcctgcagaTGTATTCCCTGTCAAAAACCTCTAAGTAATGT CC	30
directo de Sh	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGAAC AACACTAAGAAACAGCCAACCTTTATTTTGG	31
inverso de Sh	GCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCC tcagtgatggtga tggtgatggcctgcagaAAGATTTCTAAGATAATGACACAAAGCCTGT AA	32

Los vectores de pTrc99A-*exoI* se transformaron en TOP10 de *E. coli* siguiendo el protocolo para células competentes de Z (Zymo Research, U.S.A.). Las células se cultivaron en matraces de agitación con deflectores en medio de Terrific Broth (TB); se transfirieron aproximadamente 1,5 % de precultivos durante la noche a 250 ml de medio TB que contenía 100 µg/ml de ampicilina en matraces de cultivo de 1.000 ml y se incubaron a 37 °C, a 200 rpm, hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,4-0,6. La temperatura se disminuyó a 15 °C y se incubaron las células durante 30 minutos antes de que se indujeran durante 4 horas con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron por centrifugación y los sedimentos celulares se congelaron a -20 °C.

Los sedimentos celulares de los cultivos de 250 ml se descongelaron en hielo, 40 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5 a 25 °C), imidazol 5 mM, NaCl 1 M, 0,1 % de Triton X-100, 10 % de glicerol, MgCl₂ 10 mM) se añadieron y la mezcla se sometió a ultrasonidos en un baño de agua con hielo durante 10 min (25 % de amplitud, 0,1 s encendido, 0,2 s apagado) usando un sonificador Branson. El lisado se centrifugó en un tubo de 50 ml a 25.000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró en un filtro de 0,45 µm. El lisado filtrado se diluyó con 50 ml de tampón de lisis hasta un volumen total de 90 ml. Todas las etapas de purificación se realizaron con tampones helados y una columna se enfrió en hielo. Los 90 ml de lisado se aplicaron a una columna de 1 ml HisTrap HP equilibrada en un tampón de lisis usando un flujo de 1 ml/min. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón de lisis y 10 VC de tampón A2 (Tris-HCl 50 mM, (pH 7,5 a 25 °C), imidazol 5 mM, NaCl 500 mM). La proteína se eluyó luego con 20 VC de un gradiente al 0-30 % de tampón B (Tris-HCl 50 mM, (pH 7,5 a 25 °C), imidazol 500 mM, NaCl 500 mM) a un tampón A2 en fracciones de 1 ml. Las fracciones que contenían actividad ExoI se agruparon y se dializaron contra Tris-HCl 10 mM (pH 7,5 a 25 °C), NaCl 500 mM y EDTA 0,5 mM, o Tris-HCl 10 mM (pH 7,5 a 25 °C), NaCl 500 mM, MgCl₂ 10 mM y EDTA 0,5 mM, y se diluyeron 1:1 con 100 % de glicerol y se almacenaron a -20 °C.

Dos secuencias más de exonucleasa I (no desveladas) han sido examinadas, pero no se expresaron y aislaron de forma activa.

Ejemplo 2 - Perfilado de la actividad de exonucleasas: temperatura óptima para actividad catalítica

Un perfil de temperatura fue creado para caracterizar mejor las diferentes ExoI-LC recombinantes del Ejemplo 1. Las

Exol-LC diferentes se diluyeron a concentraciones que permiten la diferenciación entre las degradaciones de sustrato en el gel.

5 Debido a los diversos factores de dilución, las muestras no pudieron ser comparadas directamente entre sí, sino que podrían estimarse las diferencias relativas dependientes de la temperatura relativa en la actividad. Las muestras se incubaron durante diversos intervalos de tiempo para determinar si la enzima podría mantener una temperatura establecida durante periodos de tiempo más largos.

10 Método detallado

10 Exol-LC se diluyó (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 25 °C, MgCl₂ 5 mM) a lo que se pensaba que daría la mejor diferenciación entre muestras. Para imitar el protocolo de limpieza por PCR, las soluciones post-PCR se usaron como tampones de reacción. La robustez se logró mediante la ejecución del experimento en paralelo usando soluciones de post-PCR basadas en dos tampones de PCR diferentes; GoTaq (Promega) o TEMPase Key (VWR). Como sustrato, 5 pmol de un oligonucleótido marcado con FAM en 5' (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21) se añadió a cada
15 reacción. Tras la adición de Exol, el volumen total para cada muestra fue de 7 µl. Las muestras se incubaron en un termociclador durante 1 minuto, 5 minutos o 10 minutos a 20 °C, 25 °C, 30 °C o 37 °C seguido de 5 minutos a 80 °C. Un tampón de muestra TBE-urea (Bio-Rad) se añadió y las muestras se aplicaron a un gel de 20 % de acrilamida/urea 7 M colado y operado a 180 V durante aproximadamente 45 minutos. Todos los reactivos se mantuvieron en hielo
20 durante todo el protocolo completo a menos que se especificara otra cosa y el flujo de trabajo se realizó en bloques de enfriamiento.

20 Resultados

25 Los resultados se muestran en la Figura 12. En general, todas las Exol-LC se realizaron de manera similar en los dos tampones usados para preparar las muestras post-PCR, mostrando que los efectos observados no eran específicos de la composición de tampón de PCR.

30 Exol-LC (Ha) mostró un aumento de la actividad global hasta 37 °C y podría soportar esta temperatura durante al menos 10 minutos (Figura 12a). También se observó una buena actividad en general a temperaturas más bajas.

35 Exol-LC (Ps) mostró una mejor actividad general a 30 °C, con la pérdida de actividad cuando se usan 37 °C como temperatura de incubación (Figura 12b). También se observó una buena actividad en general a temperaturas más bajas.

Exol-LC (Sh) mostró un aumento de la actividad global hasta 37 °C, y podría soportar esta temperatura durante al menos 10 minutos (Figura 12c). También se observó una buena actividad en general en todas las temperaturas.

40 Exol-LC (Mv) mostró una mejor actividad general a 30 °C, mientras que la incubación a 37 °C resultó en la pérdida de actividad (Figura 12d). También se observó una buena actividad a temperaturas más bajas.

El uso de PAGE para un perfilado de actividad pareció resultar en una buena estimación de cómo Exol-LC se comportó dependiendo de la temperatura con el tiempo.

45 Ejemplo 3 - Perfilado de la actividad de exonucleasas: temperaturas de inactivación para actividad catalítica

En este Ejemplo, las características de inactivación térmica de Exol-LC (Sh) se compararon con diversas Exol de *E. coli* disponibles comercialmente.

50 Las características de inactivación térmica de cuatro Exol de *E. coli* comercialmente disponibles y un kit de limpieza de PCR enzimática comercialmente disponible se compararon con Exol-LC (Sh). Para asegurarse de que cualquier efecto observado era independientemente la elección de tampón de reacción, las dos soluciones de post-PCR diferentes se usaron como un tampón de reacción (TEMPase Key, TEMPase Extra, VWR). Todas las reacciones recibieron aproximadamente 10 U de Exol para permitir la comparación entre las actividades de Exol y la facilidad de
55 la inactivación térmica. La actividad de la exonucleasa de Exol-LC (Sh) fue calculada como se describe en el Ejemplo 8. Para las Exol comerciales, la actividad de la exonucleasa se tomó según lo indicado por los fabricantes. El volumen final para cada reacción fue de 7 µl. Las muestras se incubaron a 80 °C durante 1 minuto antes del enfriamiento y la adición de 5 pmol de un oligonucleótido marcado con FAM en 5' (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21). Las muestras se incubaron además a 37 °C durante 15 minutos. Después de la incubación, un tampón de muestra TBE-
60 urea (Bio-Rad) se añadió y las muestras se aplicaron a un gel de 20 % de acrilamida/urea 7 M colado y operado a 180 V durante aprox. 45 minutos. Todos los reactivos se mantuvieron en hielo durante todo el protocolo y el flujo de trabajo se realizó en bloques de enfriamiento a menos que se especifique otra cosa.

65 Los resultados se muestran en la Figura 13. Todas las Exol de *E. coli* tuvieron una actividad adecuada después de la incubación de 1 minuto a 80 °C para degradar completamente todo el sustrato. Exol-LC (Sh) fue la única Exol que se inactivó por completo, no mostrando signos de actividad residual.

Ejemplo 4 - Demostración de la utilidad de ExoI-LC (Sh) en una limpieza de PCR rápida antes de la secuenciación de ácido nucleico

5 Los experimentos se establecieron para verificar que ExoI-LC (Sh) podría llevarse a cabo de forma satisfactoria en un escenario de limpieza de PCR rápida. Para comparación y control positivo, las muestras paralelas fueron tratadas con una marca líder de reactivo de limpieza de PCR enzimática ExoSAP-IT (Affymetrix).

10 Para verificar que ExoI-LC (Sh) permitía un protocolo de limpieza de PCR enzimática de 5 minutos, Se diseñó un experimento para una prueba de esfuerzo de las limitaciones de protocolo. Así, a todas las soluciones post-PCR sometidas a ensayo se les añadieron un exceso de cebadores o dNTP tras la PCR. Si se deja sin eliminar antes de la reacción de secuenciación, los cebadores residuales darían lugar a reacciones de secuencia en la dirección opuesta y de este modo comprometen enormemente la longitud y la calidad de la reacción, y los dNTP darían como resultado relaciones ddNTP:dNTP que dejarían de producir secuencias de gran calidad. La robustez se logró mediante el uso de diferentes reactivos y amplicones de PCR.

Tras la PCR, 10 pmol de cebadores o 40 nmol de dNTP se añadieron a las soluciones post-PCR.

20 Las muestras a tratar con ExoSAP-IT se manipularon de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la adición de cualquiera de un cebador inverso o un dNTP a la solución de PCR, las muestras recibieron 2 µl del reactivo de limpieza, dando un volumen final de 7 µl. Las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C seguido de 15 minutos a 80 °C. Las muestras se establecieron usando dos tampones diferentes de PCR y todas las muestras se establecieron como triplicados.

25 Las muestras a tratar con ExoI-LC (Sh) recibieron la misma cantidad de cebadores y dNTP añadidos como anteriormente, antes de la adición de 1 µl de ExoI-LC (Sh) (10 U/µl, como se calcula en el Ejemplo 8) y 1 µl de SAP (2 U/µl). Al igual que con los controles positivos, el volumen final de las muestras fue de 7 µl. Las muestras se incubaron 4 minutos a 37 °C seguido de 1 minuto a 80 °C. Las muestras se establecieron usando dos tampones diferentes de PCR y todas las muestras se establecieron como triplicados.

30 Para evaluar cómo ExoSAP-IT se realizaría dado un protocolo idéntico a ExoI-LC, las muestras se enriquecieron con cebadores inversos antes de la adición de 2 µl de reactivo de limpieza de PCR de ExoSAP-IT. Las muestras se establecieron como duplicados.

35 Como controles negativos, las muestras recibieron cebadores inversos o dNTP, pero en lugar de soluciones de limpieza enzimáticas, las muestras recibieron 2 µl de agua. Las muestras se establecieron como duplicados.

La Tabla 2 proporciona una visión general de la configuración experimental descrita anteriormente.

Reactivo	Volumen
Solución post-PCR (TEMPase Extra, VWR o GoTaq, Promega)	4 µl
Adición dNTP (ACGT 10 mM cada uno) o Cebador inverso (10 µM)	1 µl
Limpieza de PCR ExoSAP-IT (solución de limpieza de PCR disponible comercialmente) o ExoI-LC y SAP o dH ₂ O	2 µl
Total	7 µl

40

La Tabla 3 proporciona una visión general de la incubación de limpieza de PCR

Protocolo	Incubación	Tiempo total
ExoSAP-IT	15 minutos a 37 °C → 15 minutos a 80 °C	15 minutos
	4 minutos a 37 °C → 1 minuto a 80 °C	5 minutos
ExoI-LC + SAP	4 minutos a 37 °C → 1 minuto a 80 °C	5 minutos
Control negativo	15 minutos a 37 °C → 15 minutos a 80 °C	15 minutos

45 Después del tratamiento de limpieza de PCR, las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo. Una mezcla maestra de reacción de secuenciación preparada se alicuotó en tubos distintos. Un total de 2,5 µl de cada solución tratada/no tratada se añadió a cada tubo a usar como molde en la reacción posterior de secuenciación. Las muestras se transfirieron inmediatamente a un termociclador y se inició el programa de secuenciación.

ES 2 742 186 T3

Reactivo	Volumen
BigDye v3.1 (LifeTech)	1 μ l
5X tampón de secuenciación (LifeTech)	4 μ l
Cebador de secuenciación (10 μ M)	0,32 μ l
Molde (producto de PCR tratado/no tratado con adición)	2,5 μ l
dH ₂ O	12,18 μ l
Total	20 μ l

Temperatura de ciclo	Tiempo	
96 °C	5 min	}
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
4 °C	Retención	} 25 ciclos

5 Las secuencias fueron suministradas a la Instalación central de secuenciación de ADN en la Universidad de Tromsø para la purificación y secuenciación usando un analizador genético 3130xl de Applied Biosystems. Los resultados se analizaron usando el software Sequence Scanner v1.0 (LifeTech).

10 Los resultados seleccionados se muestran en la Figura 14. Las secuencias enriquecidas con dNTP proporcionaron una buena longitud y calidad de secuencia en general, y no podría detectarse diferencia alguna entre las muestras tratadas con ExoSAP-IT o HL-Exol/SAP (resultados no mostrados). Los gráficos de secuencia de la Figura 14a son ejemplos de los resultados de las secuencias enriquecidas con cebadores inversos en el tampón para PCR de GoTaq. Fue evidente que a partir de los controles negativos que carecen de limpieza de PCR funcional se comprometió enormemente la longitud y la calidad de la secuencia. Las muestras tratadas con cualquiera de ExoSAP-IT (protocolo de 30 minutos) o Exol-LC/SAP (protocolo de 5 minutos) mostraron muy buena calidad de secuencia. Estas imágenes eran representativas para todos los replicados.

15 Los gráficos de secuencia de la Figura 14b son ejemplos de los resultados de las secuencias enriquecidas con cebadores inversos en el tampón para PCR de TEMPase Extra. Las muestras con cebadores inversos añadido mostraron una muy buena longitud y calidad tras el tratamiento con cualquiera de las soluciones de limpieza de PCR. No hubo diferencias significativas entre las muestras tratadas con ExoSAP-IT (protocolo de 30 minutos) o las muestras tratadas con Exol-LC/SAP (protocolo de 5 minutos). La carencia de tratamiento de limpieza de PCR resultó en secuencias más cortas de menor calidad. Estas imágenes eran representativas para todos los replicados.

20 Por otra parte, la Figura 14c ilustra cómo la solución de limpieza con ExoSAP-IT se realizó cuando tenía que realizar el mismo protocolo de 5 minutos como el protocolo de Exol-LC/SAP. Resulta evidente de la Figura que el tratamiento con ExoSAP-IT no resultó en secuencias de alta calidad. Esto se debe probablemente a una combinación de la degradación insuficiente de cebadores añadidos así como a la actividad de Exol residual que degrada los cebadores de secuenciación. Es probable que el uso de una configuración de reacción a temperatura ambiente comprometería aún más estos resultados debido a la actividad de Exol residual que degrada cebadores de secuenciación. Las muestras tratadas con Exol-LC/SAP mostraron una longitud y calidad excelente de secuencia global.

25 Ejemplo 5 - Experimentos de inactivación para determinar un tiempo y una temperatura de inactivación mínimos para determinadas exonucleasas lábiles al calor de uso en la invención.

30 La temperatura y el tiempo de inactivación mínimos se determinaron para cada Exol-LC en un ensayo en las condiciones de ensayo dadas. Esto se logró mediante la incubación de Exol-LC a diferentes temperaturas durante diferentes intervalos. Tras el tratamiento térmico, se añadió un ADN monocatenario marcado en 5' y se visualizó el grado de degradación del sustrato (Figura 15). La cantidad de degradación del sustrato se comparó con los resultados de la Figura 16, y la actividad residual tras el tratamiento térmico se estimó.

35 Exol-LC sin diluir se añadió al tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM), dando un volumen final de 9 μ l. Las muestras se incubaron durante 5 minutos, 10 minutos o 15 minutos a 40 °C, 45 °C, 50 °C o 55 °C o durante 5 minutos o 10 minutos a 60 °C. Tras el enfriamiento de las muestras, se añadieron 5 pmol de un oligonucleótido marcado con FAM en 5' (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21). Las muestras se incubaron además a 30 °C durante 30 minutos y luego durante 2 minutos a 95 °C. Un tampón de muestra TBE-urea (Bio-Rad) se añadió y las muestras se aplicaron a un gel de 20 % de acrilamida/urea 7 M precolado y operado a 180 V durante aproximadamente 45 minutos. Todos los reactivos se mantuvieron en hielo durante todo el protocolo y el flujo de trabajo se realizó en bloques de enfriamiento a menos que se especifique otra cosa. Los resultados de PAGE se visualizaron usando el sistema Molecular Imager PharoFX (Bio-Rad).

Los resultados se muestran en la Figura 15 e indican que diversos grados de degradación del sustrato se observan dependiendo de la temperatura y el intervalo de tiempo para la incubación por calor. En general, ninguna de las Exol-LC mostró signos de degradación del sustrato tras la incubación a 55 °C durante 10 minutos o más. Las incubaciones de la totalidad de Exol-LC a 55 °C durante 5 minutos o 50 °C durante 10 minutos no mostraron esencialmente, o a lo sumo entre 1 y 10 %, degradación del sustrato.

Ejemplo 6 - Determinación del umbral de sensibilidad para los experimentos de inactivación por medición del grado de degradación del sustrato para una serie de diluciones de exonucleasas

Con el fin de determinar la temperatura mínima de inactivación para las diversas Exol-LC del Ejemplo anterior, se determinó el umbral de sensibilidad para el ensayo de inactivación del Ejemplo 5. Se preparó un ensayo semicuantitativo usando diluciones en serie de las exonucleasas y estimando el grado de degradación del sustrato para cada dilución. Para mediciones comparativas, las mismas condiciones de ensayo y la configuración de reacción tal como se usan en los ensayos de inactivación también se aplicaron en este caso.

Cada Exol-LC sometido a ensayo se diluyó 1, 10, 100, 200, 1.000 y 10.000 veces, correspondiente a actividades al 100 %, 10 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % y 0,01 %. El mismo tampón usado como tampón de reacción también se usó como tampón de dilución (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM). El tampón de reacción y 5 pmol de sustrato marcado con FAM (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21) se mezclaron previamente antes de la adición Exol-LC. El volumen total de la reacción fue de 10 µl. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 30 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C. Un tampón de muestra de TBE-urea (Bio-Rad) se añadió y las muestras se aplicaron a un gel de 20 % de acrilamida/urea 7 M precolado y operado a 180 V durante aprox. 45 minutos. Todos los reactivos se mantuvieron en hielo durante todo el protocolo y el flujo de trabajo se realizó en bloques de enfriamiento a menos que se especifique otra cosa. Los resultados de PAGE se visualizaron usando el sistema Molecular Imager PharoFX (Bio-Rad).

Los resultados se muestran en la Figura 16 e indican que la actividad de las exonucleasas podría detectarse con aproximadamente una actividad al 1 % en las condiciones de ensayo dadas.

Ejemplo 7 - Ensayo para determinar una actividad de exonucleasa bicatenaria o monocatenaria

La actividad de la exonucleasa se mide incubando la enzima exonucleasa de prueba con un sustrato monocatenario o bicatenario marcado con 5'-FAM-ADN-TAMRA-3' corto de aproximadamente 20 nucleótidos. En caso de que la exonucleasa sea capaz de degradar el sustrato, esto se iniciará inmediatamente y se liberará el fluoróforo. La actividad puede ser seguida con el tiempo ya que el fluoróforo liberado puede volver a emitir luz tras la excitación de luz.

Específicamente, la mezcla de ensayo consiste en 1 µl, 10 µl de ADN mc/ADNbc, 10 µl de 5x TDB (Tris-HCl 250 mM, pH 8,5 a 25 °C, DTT 5 mM, 1 mg/ml de BSA, 10 % de glicerol) y 29 µl de H₂O de MiliQ. La mezcla de ensayo de 40 µl se transfiere a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano negro y 5 µl de H₂O de MiliQ o un tampón de dilución (como control negativo) y las muestras de enzima se añaden a los pocillos. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 5 µl de MgCl₂ 50 mM usando una pipeta multicanal, haciendo que el volumen final de la reacción sea de 50 µl. La fluorescencia se mide inmediatamente (excitación a 485 nm y emisión a 520 nm) y luego en intervalos de tiempo apropiados, incluyendo una etapa de agitación, y las reacciones se dejaron continuar durante 15 minutos. Un aumento en la fluorescencia indica que la degradación del sustrato está teniendo lugar.

Ejemplo 8 - Ensayo para la cuantificación de la actividad de una exonucleasa monocatenaria

La actividad de una exonucleasa de ADN monocatenario se midió mediante la incubación de la enzima con ³H-dATP desnaturalizado incorporado a un producto de PCR. Si la exonucleasa es capaz de degradar el sustrato, la exonucleasa liberará nucleótidos solubles en ácido que se pueden detectar en un contador de centelleo. El exceso del ADN de sustrato de alto peso molecular se precipita con ácido tricloroacético (ATC). En este ensayo, una Unidad (1 U) se define como la cantidad de enzima que catalizará la liberación de 10 nmol de nucleótidos solubles en ácido en un volumen final de 20 µl en 30 minutos a 30 °C.

Específicamente, la mezcla de ensayo consistió en 4 µl de 5x tampón de exonucleasa (Tris-HCl 250 mM, pH 7,5 a 25 °C, MgCl₂ 50 mM, DTT 5 mM), 5 µl de sustrato desnaturalizado (desnaturalizado por incubación durante 3 minutos a 100 °C y transferencia inmediata en un baño de agua con hielo durante 3 minutos) y 6 µl de H₂O de MiliQ. 15 µl se transfirieron a 1,5 ml de tubos de microcentrífuga en hielo. La enzima sometida a ensayo se diluyó cuando fuera necesario y 5 µl de cada muestra, control y blanco de enzima se añadieron a la mezcla de ensayo y se mezclaron por pipeteo arriba y abajo. Las muestras fueron incubadas en un baño de agua a 30 °C durante 10 minutos. Tras la incubación, las reacciones se colocaron en hielo y se añadieron inmediatamente 20 µl de ADN de timo de ternero frío en hielo (1 mg/ml) y 250 µl de ATC frío en hielo al 10 % (p/v). Las muestras se incubaron acto seguido en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Los sobrenadantes, 200 µl, se transfirieron a una placa de 24 pocillos y luego se añadieron 0,8 ml de fluido de centelleo Ultima Gold XR. Los pocillos se sellaron con cinta selladora y las muestras se mezclaron cuidadosamente por agitación. Las muestras se contaron en un contador de placas MicroBeta² durante 5 minutos.

Ejemplo 9 - Ensayo para la cuantificación de la actividad de una exonucleasa bicatenaria

5 La actividad de una exonucleasa de ADN bicatenario se mide de la misma manera que en el Ejemplo 8 con la excepción de que el sustrato de PCR no se desnatura antes de la incubación con la enzima.

Ejemplo 10 - Comparación de las actividades de exonucleasas bicatenaria y monocatenaria con las exonucleasas lábiles al calor de uso en la invención

10 La actividad de una exonucleasa de ADN monocatenario se midió mediante la incubación de la enzima de ensayo con ^3H -dATP desnaturizado incorporado a un producto de PCR. La actividad de una exonucleasa de ADN bicatenario se midió de manera similar con la excepción de que la enzima se incubó con ^3H -dATP no desnaturizado incorporado a un producto de PCR. Si una exonucleasa es capaz de degradar el sustrato, la exonucleasa liberará nucleótidos solubles en ácido que se pueden detectar en un contador de centelleo. El exceso del ADN de sustrato de alto peso molecular se precipita con ácido tricloroacético (ATC). En este ensayo, una Unidad (1 U) se define como la cantidad de enzima que catalizará la liberación de 10 nmol de nucleótidos solubles en ácido en un volumen final de 20 μl en 30 minutos a 30 °C. Específicamente, la mezcla de ensayo consistió en 4 μl de 5x tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 250 mM y MgCl_2 25 mM), 5 μl de sustrato (para obtener ADN mc, el sustrato de ADNbc se desnaturizó por incubación durante 3 minutos a 100 °C y se transfirió inmediatamente en un baño de agua con hielo durante 3 minutos) y 3 μl de H_2O de MiliQ. La mezcla de ensayo, 12 μl , se transfirió a 1,5 ml de tubos de microcentrífuga en hielo. La enzima sometida a ensayo se diluyó y 8 μl de muestra de enzima se añadieron a la mezcla de ensayo y se mezclaron por pipeteando arriba y abajo. El control y el blanco también se incluyeron en la configuración. Las muestras fueron incubadas en un baño de agua a 30 °C durante 10 minutos. Tras la incubación, las reacciones se colocaron en hielo y se añadieron inmediatamente 20 μl de ADN de timo de ternero frío en hielo (1 mg/ml) y 250 μl de ATC frío en hielo al 10 % (p/v). Las muestras se incubaron acto seguido en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Los sobrenadantes, 200 μl , se transfirieron a una placa de 24 pocillos y se añadieron 0,8 ml de fluido de centelleo Ultima Gold XR. Los pocillos se sellaron con cinta selladora y las muestras se mezclaron cuidadosamente por agitación. Las muestras se contaron en un contador de placas MicroBeta² durante 5 minutos.

30 Los resultados se resumen en la Tabla 4 y muestran que la Exol-LC de uso en la invención muestra muy poca actividad contra ADN bicatenario en comparación con la actividad contra ADN monocatenario. Resulta, sin embargo, difícil concluir si las bajas cantidades de actividad contra ADN bicatenario están relacionadas con las propiedades intrínsecas de las enzimas o es causado simplemente por contaminaciones de las enzimas. La dos Exol comerciales (Exol A y Exol B) sometidas a ensayo también mostraron una actividad muy baja contra ADN bicatenario.

35

Tabla 4. Actividad de Exol-LC y Exol comercial contra ADNmc y ADN bc.

	Actividad contra ADNmc (U/ μl)	Actividad contra ADNbc (U/ μl)	Actividad relativa contra ADNbc y ADNmc (%)
Exol-LC de Ha	50,9	0,05	0,10
Exol-LC de Ps	11,2	0,02	0,18
Exol-LC de Sh	65,1	0,01	0,02
Exol-LC de Vw	21,0	0,01	0,05
Exol-LC de Mv	16,7	0,01	0,06
Exol A	16,7	0,01	0,06
Exol B	41,2	0,01	0,02

Ejemplo 11 - Perfilado de la actividad de exonucleasas: determinación de la direccionalidad usando un gel de poliacrilamida con urea

40

Este experimento se realizó con el fin de verificar que la Exol-LC de uso en la invención exhibió una actividad exonucleasa 3' a 5' y una actividad exonucleasa 5' a 3' no sustancial. La especificidad del sustrato se analizó usando bien un oligonucleótido marcado con FAM en 5' o bien con FAM en 3' (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21) en un gel de poliacrilamida.

45

Cada Exol-LC sometida a ensayo se diluyó a una concentración final de aproximadamente 0,1 U/ μl . Se prepararon dos mezclas maestras, una para el oligo marcado con FAM en 5' y otra para el oligo marcado con FAM en 3'. La mezcla maestra contenía un tampón de reacción (Tris pH 10 mM, pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM) y el respectivo sustrato marcado con FAM, dando una cantidad final de 0,25 pmol de sustrato por reacción. Un control negativo, que contenía un tampón de dilución en lugar de solución de enzimas, y un control positivo, que usa Exo I de *E. coli*, fueron incluidos. Las enzimas se pipetearon en los tubos de reacción preenfriados y luego se añadió la mezcla maestra con el tampón de reacción y el sustrato. Todas las reacciones consistieron en un volumen final de 10 μl y se incubaron a 30 °C durante 1 h. Las reacciones de detuvieron añadiendo 2,5 μl de tampón de carga de muestra (formamida al 95 %, EDTA 10 mM, xileno) y se incubaron a 95 °C durante 5 min. Para el análisis, 6 μl de las muestras se cargaron en un

50

gel de acrilamida al 12 %/urea 7 M. El gel fue analizado a 50 W durante 1 h y 45 minutos. Durante la configuración de las reacciones, todos los reactivos y muestras se mantuvieron en hielo.

Los resultados se muestran en la Figura 17. Se observan diferencias claras entre el sustrato marcado con FAM en 5' y el marcado con 3', lo que indica que la direccionalidad 3' a 5' de las diferentes Exol-LC así como para el control de Exol de *E. coli*. Cuando FAM se marcó en el extremo 5', una escalera de bandas de producto intermedio leves e intensas parciales se observaron al indicar la Exol que degrada el sustrato desde el extremo 3'. Cuando el oligo fue marcado con FAM en el extremo 3', el fluoróforo se cortó inmediatamente, generando solo el monómero FAM en 3'.

10 Ejemplo 12 - Perfilado de la actividad de exonucleasas: direccionalidad en la estructura de cristalización

Para apoyar aún más la direccionalidad de las enzimas de Exol I LC de uso en la invención que tiene direccionalidad 3'-5', la Exol-LC (Mw) se cristalizó con ADNmc y la estructura del complejo se determinó.

15 La cristalización de proteínas se realizó con una concentración de proteínas de 5,4 mg/ml. El oligonucleótido de 13 mer desalado (dT13) se adquirió en Sigma Aldrich y se añadió a la proteína en un exceso de 1,2 molar. Para inhibir la degradación de ADNmc por la exonucleasa I, se añadió EDTA 10 mM. Las gotas se establecieron de forma automática en un formato de 96 pocillos en placas de cristalización de 2 pocillos MRC (Swissci, Hampton Research) con Phenix (Art Robbin Instruments) usando la técnica de difusión de vapor por gota colgante. El tamaño de la gota fue de 0,4 µl (0,2 µl + 0,2 µl) y el volumen de la solución de reservorio fue de 60 µl. Las placas de cristalización se incubaron a 4 °C.

20 Un cristal co-cristalizado con dT13/EDTA se cultivó con 20,02 % de PEG MME 5000, Na-acetato 0,1 M pH 4,5 y Ca-acetato 0,09 M. El experimento de difracción de rayos X se realizó en el ESRF en Grenoble (Francia). El cristal se difractó a una resolución de 2,5 Å. La determinación de la estructura ha sido realizada por reemplazo molecular con la Exol de *E. coli*. (PDB: 1FXX) como el modelo de búsqueda.

25 En las primeras rondas de refinamiento, la densidad electrónica para el ADNmc llegó a ser visible y todos los nucleótidos se podrían encajar. El ADNmc se une con el extremo 3' en el sitio activo de una manera similar vista para Exo I de *E. coli* (Korada *et al.*, Nucleic Acids Research, 2013, 41(11):5887-97) que proporciona evidencia estructural para la direccionalidad 3'-5' de Exol-LC (Mw).

30 Ejemplo 13 - Perfilado de la actividad de exonucleasas: inactivación rápida de ciertas Exol-LC de uso en la invención a 80 °C.

35 Este experimento se realizó para confirmar que algunas de las Exol-LC de uso en la invención podrían llevarse a cabo de manera satisfactoria en un escenario de limpieza de PCR rápida. En este experimento, las características de inactivación térmica de la HL-Exol sometida a ensayo a 80 °C se compararon con dos Exol I de *E. coli* comercialmente disponibles (Exol A y Exol B).

40 Las actividades de la Exol-LC de uso en la invención contra ADNmc se calcularon como se describe en el Ejemplo 8, con la excepción de que la 1x mezcla de ensayo consistía en glicina-KOH 67 mM, pH 9,5, NaCl 63,5 mM, MgCl₂ 9,2 mM, DTT 10 mM que incluye ADNmarcado con ³HdA. Para las Exol de *E. coli* comerciales, la actividad se tomó según lo indicado por los fabricantes. Para imitar la limpieza en una configuración de limpieza por PCR, un tampón post-PCR se usó como tampón de reacción. La composición del tampón de reacción era de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 (25 °C), KCl 45 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, DyNAzyme II (Thermo Fisher Scientific™, anteriormente Finnzymes™) y los restos de dNTP (inicialmente 200 µM de cada uno antes de llevar a cabo la reacción de PCR), los restos de cebadores (inicialmente 200 nM de cada cebador antes de llevar a cabo la reacción de PCR) y molde.

50 Cada reacción recibió 10 U de Exol, dando un volumen de reacción final de 7 µl. El experimento contenía tanto un control de actividad para todas la Exol, así como una comprobación para la actividad residual tras la incubación por calor. Para el control de la actividad, el tampón de reacción, Exol y 5 pmol de sustrato (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21) se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C seguido de 95 °C durante 20 minutos. Para las muestras a analizar con respecto a la inactivación a 80 °C, el sustrato se añadió sustrato después de una incubación de 1 minuto a 80 °C y posterior enfriamiento. Estas muestras se incubaron posteriormente durante 15 55 minutos a 30 °C seguido de 95 °C durante 20 minutos. Tras todas las etapas de incubación, un tampón de muestra TBE-urea se añadió y las muestras se aplicaron a un gel de 20 % de acrilamida/urea 7 M precolado y operado a 180 V durante aproximadamente 45 minutos.

60 Los resultados se muestran en la Figura 19. Todas las Exo I tuvieron una actividad adecuada en este ensayo. Solo las Exol-LC se inactivaron seguido de una incubación de 1 minutos a 80 °C, mientras que Exo I de *E. coli* comercialmente disponible mostraron una actividad residual adecuada que degrada el 100 % del sustrato. La Exol-LC, pero no la Exol comercial, era compatible con un rápido protocolo de limpieza de PCR de 5 minutos.

65 Para comparar aún más la facilidad de inactivación de Exol-LC (Sh) con la de Exol de *E. coli* disponibles comercialmente, 10 U de cada Exol se incubaron durante 1, 5, 10 o 20 minutos a 80 °C antes del enfriamiento y la adición de 5 pmol de un sustrato marcado con FAM en 5' (GCTAACTACCACCTGATTAC; SEQ ID NO: 21). Las

muestras se incubaron además durante 15 minutos a 30 °C seguido de 20 minutos a 95 °C. La configuración de reacción era, por lo demás, idéntica al experimento anterior, usando el mismo tampón de post-PCR como el tampón de reacción. Un control de la actividad se incluyó para las tres Exol, y estas muestras no se sometieron a incubación por calor antes de la incubación a 30 °C durante 15 minutos. La actividad residual fue visualizada en un gel de urea-PAGE como se ha descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en la Figura 20. La actividad residual sustancial se observó en Exol comercialmente disponible tras el tratamiento térmico a 80 °C para casi todas las duraciones de tiempo. En comparación, no pudo detectarse actividad residual alguna en las muestras tratadas con Exol-LC (Sh) que habían sido tratadas a 80 °C durante un solo minuto.

Ejemplo 14 - Demostración de la utilidad de Exol-LC en una limpieza de PCR en un tubo rápida antes de la secuenciación de ácido nucleico.

Este ejemplo se realizó para mostrar la funcionalidad de ciertas Exol-LC de uso en la invención en una situación de limpieza de PCR. La configuración experimental fue muy similar al Experimento 4. Al igual que en el Ejemplo 4, a la solución post-PCR sometida a ensayo se le añadió un exceso de cebadores (10 pmol) tras la PCR. Sin embargo, a diferencia del Ejemplo 4, solo se usó un tampón de PCR (GoTaq, Promega), la temperatura de incubación para muestras tratadas con Exol-LC se redujo de 37 °C a 30 °C y solo el protocolo regular de 30 minutos se sometió a ensayo para ExoSAP-IT.

Antes del inicio del experimento, la actividad de cada Exol-LC fue calculada como se describe en el Ejemplo 8, con la excepción de que la 1x mezcla de ensayo consistía en glicina-KOH 67 mM, pH 9,5, NaCl 63,5 mM, MgCl₂ 9,2 mM, DTT 10 mM que incluye ADNmarcado con ³HdA. Las muestras tratadas con Exol-LC recibieron la cantidad de cebadores y dNTP como se ha indicado anteriormente, antes de la adición de 2 µl de Exol-LC premezclada (10-20 U/µl) y SAP (1,5 U/µl). El volumen total para cada reacción de limpieza fue de 7 µl. Las muestras se incubaron 4 minutos a 30 °C seguido de 1 minuto a 80 °C. Las muestras se establecieron como triplicados.

Para comparación y control positivo, las muestras fueron tratadas con una marca líder de limpieza de PCR enzimática; ExoSAP-IT™ (Affymetrix™). Las muestras tratadas con ExoSAP-IT se manipularon de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la adición de cebadores a la solución de PCR, las muestras recibieron 2 µl del reactivo de limpieza de PCR, dando un volumen final de 7 µl. Las muestras tratadas con ExoSAP-IT se incubaron 15 minutos a 37 °C seguido de 15 minutos a 80 °C. Las muestras se establecieron como triplicados.

Los controles negativos se establecieron y estos recibieron la misma cantidad de cebadores que las muestras tratadas. En lugar de soluciones de limpieza enzimáticas, estas muestras recibieron 2 µl de agua. Las muestras se establecieron como triplicados.

El Ejemplo 4 debería referirse con más detalles.

Las secuencias fueron suministradas a la Instalación central de secuenciación de ADN en la Universidad de Tromsø para la purificación y secuenciación usando un analizador genético 3500xl de Applied Biosystems. Los resultados se analizaron usando el software Sequence Scanner v2.0 (LifeTech).

Los resultados seleccionados se muestran en la Figura 21, en la que los gráficos de secuencia son ejemplos representativos de los resultados de las secuencias enriquecidas con cebadores inversos en el tampón para PCR de GoTaq. Fue evidente que a partir de los controles negativos que carecen de limpieza de PCR funcional se comprometió enormemente la longitud y la calidad de la secuencia. Las muestras tratadas con cualquiera de ExoSAP-IT (protocolo de 30 minutos) o Exol-LC/SAP (protocolo de 5 minutos) mostraron muy buena calidad de secuencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método de eliminación de ADN monocatenario de una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con una exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en la muestra y luego calentar la muestra tratada con exonucleasa para inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma, en el que dicha exonucleasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50 % idéntica a la misma, en el que dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma
- (i) es sustancialmente inactivada de forma irreversible por calentamiento a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 10 minutos en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM;
- (ii) es sustancialmente específica para ADN monocatenario; y
- (iii) tiene una actividad de exonucleasa 3'-5'.
2. Un método de eliminación de ADN monocatenario de una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con una exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en la muestra y luego calentar la muestra tratada con exonucleasa para inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma, en el que dicha exonucleasa tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- (a) SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
- (b) SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
- (c) SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
- (d) SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 65 % idéntica a la misma, o
- (e) SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 % idéntica a la misma,
- en el que dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma
- (i) es sustancialmente inactivada de forma irreversible por calentamiento a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 10 minutos en un tampón que consiste en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 25 °C, KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM;
- (ii) es sustancialmente específica para ADN monocatenario, y
- (iii) tiene una actividad de exonucleasa 3'-5'.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha exonucleasa tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 5 y SEQ ID NO: 11 a 15.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra es una muestra de macromoléculas biológicas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra comprende ácido nucleico, una proteína, un polímero de carbohidratos o un lípido.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha muestra comprende ácido nucleico bicatenario, un dúplex ADN:ARN de interés o una proteína producida de forma recombinante.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha muestra es el producto de una reacción de amplificación de ácido nucleico o el producto de una reacción de transcripción inversa.
8. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que dicha reacción de amplificación de ácido nucleico se selecciona entre PCR, 3SR, SDA, LAR/ICR, y LAMP.
9. Un método de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo dicho método una etapa, posterior a la etapa de amplificación final, que consiste en poner en contacto el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico con la exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en el producto y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho producto es el producto directo de la etapa de amplificación final.
11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que dicho método comprende además, posterior a la etapa de amplificación final, poner en contacto una fosfatasa alcalina con el producto de la reacción de amplificación

antes de, al mismo tiempo, o después de, poner en contacto dicho producto con la exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma, en condiciones que permitan la desfosforilación de cualquier nucleótido trifosfato sin incorporar presente en el producto.

5 12. Un método de transcripción inversa, comprendiendo dicho método una etapa, posterior a la etapa de transcripción inversa final, y/o, si está presente, la etapa de síntesis final de ADNc de segunda cadena, que consiste en poner en contacto el producto de la reacción de transcripción inversa con la exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en el producto y luego calentar la mezcla para
10 inactivar dicha exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma.

13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho producto es el producto directo de la etapa de transcripción inversa final, y/o, si está presente, el producto directo de la etapa final de síntesis de ADNc de segunda cadena.

15 14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que dicho método comprende además, posterior a la etapa de transcripción inversa final, y/o, si está presente, la etapa de síntesis final de ADNc de segunda cadena, poner en contacto una fosfatasa alcalina con el producto de la reacción de transcripción inversa antes de, al mismo tiempo, o después de, poner en contacto dicho producto con la exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma, en condiciones que permitan la desfosforilación de cualquier nucleótido trifosfato sin incorporar presente en
20 el producto.

15. Un método de análisis de la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicho método una etapa de preparación de la muestra antes de la(s) etapa(s) de análisis, comprendiendo dicha etapa de preparación de muestra poner en contacto la muestra a analizar con la exonucleasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones que permitan la digestión de al menos una porción de cualquier ADN monocatenario presente en la muestra y luego calentar la mezcla para inactivar dicha exonucleasa o
25 fragmento enzimáticamente activo de la misma.

16. El método de la reivindicación 15, en el que dicha etapa de preparación de muestra comprende además poner en contacto una fosfatasa alcalina con la muestra a analizar antes de, al mismo tiempo, o después de, poner en contacto la muestra con la exonucleasa o fragmento enzimáticamente activo de la misma, en condiciones que permitan la desfosforilación de cualquier nucleótido trifosfato sin incorporar presente en la muestra.
30

17. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que dicho análisis de secuencia de ácido nucleico es una técnica de secuenciación o una técnica basada en una sonda de hibridación de oligonucleótidos.
35

Figura 1: Exonucleasa de Shewanella sp.

Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO. 6)

atgaacaacactaagaacagccaactttatggcagcattatgaaacattgggtgctaaccagccaaagataggccatcgagttgctgg
 tgtgctaccgacatggatctcaatatcattgctgagcctgtcacatttactgtaaagtcggaatgactacctgccctcacctgaagctatattaat
 ta caggataacaccacagcttgtaacctaaagggatgacctgaagctgagttatggcacaatccaccagttgtagccaagaaaatacc
 tggttggtgggttacaactcaattagattgatgagaagctcccgtatggctttaccgtaacttttgaccctgatgtagagaatggaaaaac
 ggtaatagtcgctgggatacattgatttagctgctgttatgaccttagcccgatggaataaactggccacaaaaagaagatggctctcca
 agtttaactcgaacacttaaccgtgccaatggccttagccatgaaaaagcccacgatgctatgctgatgtagtccactattgcatggct
 aagcttacaatcagtcagcctaaattgttgaatattactcaatctgcccgaacaggaagttcgaagctaactgacgtactagaaat
 gaaaccgttagtgcatgtaagtcaagattagcgcgtaaatggctgtaccacattaatcgccgctggcctttcacacgactaataaaaat
 gcggtatctgtcaatttagccatggatgacgcccattgagtgaccgagcaaatcgagagcgcgatgtacacaaggcgtgatg
 atttagcgaagatgagttacctattggcatcaacaaatccatcaacaaaagtccattattgcccgtgctaaatcattaaccgatgaaaat
 gccgctcgtctgatattgataaagcattgcaagagatcaatataagcggcttagacagcaccagagatacagaaaaagctcgttggcgggt
 ttgacatcgagtcgcatcattaccgatcccgatctcagcttatagcgggtggcttttagccatgcccgataaagcaaaaatggagatgat
 ccgtaataccaaacctattaatttagccgactggagctgtcattgacgatgagcgttaccagaaatggtgatcagatagagcacgtaattat
 cctgaaacactggatgaatctgagagcattcgttggcgtgaattctgcaatcaaggctcaatgatcctgattacatgataaaactgaaaacatt
 attgaacaaccgagcaagatgaagtaaagcaaaaattattacaggctttgtgctattatctagaaaatcttag

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 1)

MNNTKKQPTLFWHDYETFGANPAKDRPSQFAGVRTDMDLNIIAEPVTFYCKVANDYLPSEAILITGIT
 PQLANLKGMPAEFMAQIHQLFSQENTCVVGYNSIRFDDEVSRYGFYRNFFDPYAREWKNNGNSRW
 DIIDLVRACYAFRPDGINWPQKEDGSPSFKLEHLTVANGLSHEKAHDAMSDVYATIAMAKLIKSVQPKL
 FEYYFNLRRKQEVSKLIDVLEMKPLVHVSSKISALNGCTTLIAPLAFHTTNKNAVICVNLAMDVTPLIELT
 AEQIRERMYTRRDDLADELPIGIKQIHINKSPFIAGAKSLTDENAARLDIDKAFARDQYKRLRQHPEIR
 EKLVAVFDIESDRIITDPLQLYSGGFFSHADKAKMEMIRNTKPINLALELSFDDERLPEMLYRYPYR
 NYPETLDESESIRWREFCQSRLNDPDYMIKLENIIEQTEQDEVKQKLLQALCHYLRLN*

Figura 2: Exonucleasa de Halomas sp.

Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO. 7)

atggcaccaccaatgctgccccctgccagtttctctggcatgattatgaaacctcggggctgacccgcgccgcatcgccccgctcagttcgct
 gcactgcgcacggatgcagaactgaacgagatcggtagcccatcgagctctactgcaaaccgccgatgactacctgctcatctgctgc
 ctgttgatcaccggtattaccctcaaaaagcccagcgcgatggtctccccgaagcagagttcgcggtgagaltcagccacatgagcga
 gccgggtacctgctagtgggctacaacagcctgctgtttgatgacgaagtttcgcccacctgtttaccgcaattgctgacccttattccgcg
 agtggcaaaacggcaattcccctgctgggatttaacgatattgtgctgcccctttatgctgctgcccggatggcattgaatggccgctgcgcaa
 gacggtgcacccagcttaagctcgagcacttaactgccccaacggcattgcccatgaggggtgccacgatcggtggcagatgctccgcg
 tactatgccttggcgcggttctcaaagtcgcaatccaagctgtttgactatctgctcggcctgcccggtaagcgcggtggccaagcag
 ctcgactgcccaacgccaaccgctgctgcatactcccgcgttaccctgtagccgggctgtagtgcactagtcacccgctggccgagc
 acccgacaaccctaatgggggtattgttacgattgagcgttatccagcagatgctgagcatgctgcccggagcaaattcgtgagcgggt
 gtttgcagtcagcaggatctcgcgaagggcagggcgcgcatccgctaaagatcatccatalcaaccgctgccagtggtgttccccgctagt
 gctttgaaagacgttgaggggctcatcagggcgagatggcaccatcgtcgcgcgcttaggcttagatgtggctgctgcccagcactgg
 aaaaccctgcgcatgcccagcgggtgctgccglaaggtcggcaggggttttagtccggttacgacgatgacccaagacctgatctaag
 ctctattcgggagttctctccgctgctgaccgtcagcagatggagcgggtgcgagagatggaaccgtgggacctggtcggtcagcgtttgc
 gtttcaggatcccgcttgaagagatgctgttctgctgctgctgagcagttaccccgacagcttgaagggcaagagcgcgagcagtgggga
 ggcgttctgctggatcggatcaatgaccggccttggcggccttacgcttaaggcgttgcgcccgaatcgagcagtcacaatcagcaaac
 cctcactgatcgcgagcggcaggttctggaagagcgtggtgatgtcgtggaagccatgatgccggcccaggcatttgatgcctga

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 2)

MASPNAAPASFLWHDYETFGADPRRDRPAQFAALRTDAELNEIGEPIELYCKPADDYLPHPAACLITG
 ITPQKAQRHGLPEAEFAGEIQRHMSEPGTCVVGYNLSLRFDEVSRHLFYRNLLDPYSREWQNGNSR
 WDLIDIVRAFYL RPDGIEWPLREDGAPSFKLEHLTAANGIAHEGAHDAVADVRATIALARLLKVRNAK
 LFDYLLGLRGKRAVAKQLDLPNAKPLLHISRRYPASRGCSALVMPLAEHPTNPNGVIVYDLSVDPSDM
 LSMSAEQIRERVFVSQQDLAEGEARIPLKIIHINRCPVFPASALKDVEGPHQGEYGTIVARLGLDVAA
 CRQHWKTLRDASGVAAKVAEVFSAGYDDVPQDPDLMLYSGSFFSAADRQQMERMVREMEPWDLVG
 QRFAFQDPRLEEMLFRFRARSYPDTLEGEEREQWEAFRWMRINDPALAGFTLKAFAREIEQYNQQT
 LTDREERQVLEELVMFVEAMMPAQAFDA*

Figura 3: Exonucleasa de *Vibrio wodanis*

Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO. 8)

atgccgcaggataacgcaccaagttctctttttgattatgaacatggggaactagcccatctctcgatcgcccatgccaattgctggagttcg
 taccgatgaagattcaatatacattggtagccattagttactgtcgccccaattgatttllaccttctcctgaagcctgttaactactggcat
 cacgccacaaactgcggtaataaaggcctgtctgagcctgagttcattactcaaatccataacgaattatcaaaaccaaatactgtcgcta
 ggctataacaacattcgtttgatgatgaagttctcgctacacctatatacgttaactcttgaaccgatggctggagctggcaaaacggcaactc
 gcgltgggatctacttgatgtaatgcgtgctglatgctctgctcctgaaggcattaaatggccaaaagacgaagaaggcaaaccaagcttt
 agattagaaaaactctcgcaagcaaatggcattgaacatgaaaatgccacgatgcgatggccgatgttattgccaccatcgagttagctaaa
 gtcgttaaaaaagcacaacctaaaatgttaactacctgttctatgctgataaaaaagaaagcggcaacgtaatcgatattgttgaatgac
 accgttaatgcacgtgctggtatgttggcgtagatagaggcaatattagttgattgtcctgttggcttggcatcctaccaataacaacgccgta
 ttacgattgatttagcgttagaccaagtgttcttagaattagatgcagagcaattacatcaacgatgtalaccaaactgctgtagcttagccc
 ctgacgaattgcctgttctgtaaaatagtagatatacaagtgccctattcttgcgctgctaaaacattgacggctgagaatgctgaaaatct
 aaatgtggacagagccgctgttaaaaaatctaaagtgatccgtgataaccctgagatcagacaaaagcgaattgctgcttacagcattgag
 cctaattatgagaaatcaaccaatgtagatacccttctatgatggttctctctcatgctgataaaaacgacgattgatattatccgtcagcaacg
 cctgagcagcttatcgatttgaaccaaatgacagtgaccacgcattaaacctctatttccgctatcgctgcgcaattcccgcatacgcctaa
 tgagacagagcaactgaaatggcaatcacattacaagattactccaaactattacctaatacgaatcaagcttgagaattatcttga
 atctgaaggcaatgagaaaagactgcatcctcgccgcttataattacgtacaacagttagatcatga

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 3)

MPQDNAPSFDDYETWGTSPSLDRPCQFAGVRTDEDFNIIGEPLVIYCRPPIDYLPSEACLITGIP
 QTAVNKGLSEPEFITQIHNELSKPNTCSLGYNNIRFDDEVSRVTLRNFPEPYGWSWQNGNSRWDLL
 DVMRAVYALRPEGIKWPKDEEGKPSFRLEKLSQANGIEHENAHADAMADVIATIELAKVVKKAQPKMF
 NYLLSMRHKKKAATLIDIVEMTPLMHVSGMFGVDRGNISWIVPVAWHPTNNNAVITIDLALDPSVFLEL
 DAEQLHQRMYTKRADLAPDELPVPVKLVHLNKCPI LAPAKTLTAENAENLNVDRACLKNLKVIRDNP
 EIRQKLIALYSIEPNYEKSTNVDTLLYDGGFFSHADKTTIDIRQSTPEQLIDFEPNVSDPRIKPLLFYRARR
 NFPHTLNETEQLKWQSHLQDYFQTHLPEYESSFENLYLESEGNEKKTAILRAVYNYVQQLVS

Figura 4: Exonucleasa de *Psychromonas* sp.

Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO. 9)

atgaatcaagaatccccaagcctctttggcagcattatgaaacctcgggttaaaccaggaacggatcgcccttctcagttgcaggcattcgt
 actgatcttgattaaatatcatttctgagccttatcaatggactgcagaccaccaacgattttacctgctcctgaagcgtgtagtaacggga
 ataacaccacaatatgcgttgcaacatggtgaattgaaaaccaattatattaatattgcagcaattccaacagcaaaacacgtgcgtggt
 gggataacaatattcgcttgatgatgaagtcacacgcttactttgatcgaatttcatgacccttatcaagagaatggcaaaatggctgctct
 cgctgggacattattgacatggtcgcgctgctatgcactcagaccagaaggattgaatgggtattgatgaaaatgatgcgccaagtttaaa
 cttgagttattaactaaagctaatagacattgttcacagcaagcacatgatgcatgctggatggttatgccactatgccatggcaaaactaatta
 agacagcacatccaaagctatatgactattgtatagttgagacaaaaaataaagtattaaacgaactgaagcttggtagcattaaacctttag
 ttcatatctcgtgatgtttctgcatgcaaggctgtgttcttattttacatcgcaaacaccaagtaacaataatgcagtgatagtgcttgatt
 taaataaagataattcacaactttatcgttgagtggtgaagatatccaatcttactatataaccgctacggataattaccagagggattaatagac
 cccctattaaatcatattaataaatgccctatcgtagcaagtgcaaaaacattaagtgcagagagagcaaaagaattaggggttgatgc
 aaaacaatgccgcaatcaatggatcgttctcagaaaataaacattgggtgagaaactgattgcagtggttagactgaatccaaaagcagc
 aaggaacaacaaccagaacaaaaattgtattctggcgggttccctactgctaacgacaaaaatcaagcaaaaagcgatcaccagtttgcgcc
 acaacaattgctaattaccaagttactttgatgatcctaatttgataattatggggcgatacaaaagcaagaaattatccgcaaatgttatcact
 tgaagagcaacaaaaatgggtagacacagagaagcttatcttattgaacatgtagataattatgttcacgcttagaaatgctagtgattgag
 catcaacatagcccagaaaagatcgaagtattgcaaaaactgggacattacttagagttttgacaggggaatacataa

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 4)

MNQESPSLLWHDYETFGLNPGTDRPSQFAGIRTDLDLNIIEPYQWYCRPPNDYLPAPEACLVTGITP
 QYALQHGEFENQFIFNILQQFQQNTCVVGYNNIRFDDEVTRFTLYRNFHDPYQREWQNGCSRWDII
 DMVRACYALRPEGIEWVFDENDAPSFKLELLTKANDIVHQQAHDAMSDVYATIAMAHLIKTAHPKLYD
 YCYSLRQKNKVLNELKLGTFKPLVHISGMFSAMQGCCSYILPIAQHPSNNNAVIVLDLNKDISQLLSLS
 VEDIQSYLYTATDNLPEGINRPPIKLIHINKCPIVASAKTLSAERAKELGVDAKQCRQSMDFSENKHLV
 EKLIAVFDTESKSSKEQQPEQKLYSGGFPTANDKNQAKAITSLSPPQIANYQVTFDDPNFDNLWWRY
 KARNYPQMLSLEEQQKWGRHREAYLIEHVDNYVARLEMLVIEHQHSPEKIEVLQKLGHYLEFLTGNT*

Figura 5: Exonucleasa de Moritella viscosa

Secuencia nucleotídica (SEQ ID NO. 10)

atggataacaattcgaacaaaacagcaacagatctgccacttttactggcatgattatgagactttggcttaaglcctgactggatcgccctt
 ctcaatttgctggtattcgcaccgacatggactttaatgtagatcggcgaaccagatatgtttactgccgccaatcagatgattaccttccttcgcca
 gaagctgccatgattactgggataaacacctcaaaagaccaagcagaagggtgaagtgaagcagagttcagtaaacgtattgaagcgcaat
 tcagtcaaaaaaacacctgtatcattgggtataacaacattcgtttgatgatgaagtaacacgtaatatctctaccgtaatttctacgaccatac
 gcacacacctggaagatggtaattcgcgctgggatattatgacttgatgacgctgttatgctctgcgccctgaaggattgatggccagaa
 aatgatgatggtctaccaagtagtgcgtctgaattataaccgcccgaatggcattgagcagcctaagccatgatgctacttctgatgatatg
 caactatcgcgatggcgaagctagtaaagaaaaacaacctaagctgtttgatttcttattaacctacgtagcaaacgtaaagtgaatccttgg
 ttgatalcatcaacatgacaccattagtgcatgaagcggcatgtttgggtgcagatcgcggttcacaagctgggtagtgcactggctggcac
 ccaaccaacaacaacgctgtgattgtagctgacttagcccaagacattacgccattattagaattgagcgcggatgaactgcgcaacgtttat
 atacgccaagaaagatctcggtagcttaaccctatcccctgaaacttattcatatcaacaagtgccagtagctcgcgccagcgaactct
 attactgaaaacgcagaacgttagggattgatcgcagcgcctgcctcgaacctaacaacgtttaaagaaagcgaacactgcgtgaa
 aatgttgggtgtttatcaagtagaacgtaataccaatacaaccaatgtggatgcaatgatctacgatggttcttagtgaggatgataaag
 caaacttgaataactactgtaaacagcaccagagcaacttacaggactgcaactgaaagtcagtgattcgcgtttaaataatattctccgct
 atcgagcagtaactcccgtattattatcaatgcctgagcaacaaaaatggcttgaccactgccgaactgtgctagaagacagtgccccag
 cctattttgcacgttttagatgcattagcgtatgaaaaacagccatgacgagcgaataatgaaactacttcaacagttatacctttatggtaaaaa
 ataattggcgcataa

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 5)

MDNNSNKTATDLPTFYWHDYETFGLSPSLDRPSQFAGIRTDMDFNVIGEPDMFYCRQSDDYLPSPE
 AAMITGITPQKTAEGVSEAEFSKRIEAQFSQKNTCIIGYNNIRFDDEVTRNIFYRNFYDPYAHTWKDG
 NSRWDIIDLMRACYALRPEGIVWPENDDGLPSMRLELLTAANGIEHANAHDATSDVYATIAMA KL VKE
 KQPKLDFDLFNLRSKRKVESLVDIINMTPLVHVS GMFGADR GFTSWV VPLAWHPTNNNAVIVADLAQ
 DITPLLELSADELRERLYTPKKDLGDLTPIPLKLIHINKCPVLAPAKLLPEN AERLGIDRSACL ANLKRL
 KESATLRENVGVYQVEREYPKSTNVDAMIYDGF FSAGDKANFEILRETAPEQLTGLQLKVS DSRFN
 ELFFRYRARNFPHLLSMPEQQKWL DHCRTVLEDSAPAYFARLDALAIENSHDERKMKLLQQLYLYGQ
 KIIGA

Figura 6 (cont.)

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
E. coli K12      APLAWHPENR NAVIMVDLAG DISPLLELDS DTLRERLYTA KTDLG-DNAA
Halomonas       MPLAEHPTNP NGVIVYDLSV DPSDMLSMSA EQIRERVVVS QQDLAEGEAR
Vibrio wodanis  VPVAWHPTNN NAVITIDLAL DPSVFLELDA EQLHQRMVTK RADLAPDELP
Shewanella      APLAFHTTNK NAVICVNLAM DVTPLIELTA EQIRERMYTR RDDLAEDELP
Psychromonas    LPIAQHPSNN NAVIVLDLNLK DISQLLSLSV EDIQSYLYTA TDNLPEGINR
Moritella viscosa VPLAWHPTNN NAVIVADLAQ DITPLLELSA DELRERLYTP KKDLG-DLTP
Consensus       *:* * . * *.*.* :* * : ::: : : :. :. : * .
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350
E. coli K12      VPVKLVHINK CPVLAQANTL RPED----- ----ADRLGI NRQHCLDNLK
Halomonas       IPLKIIHINR CPVVFPASAL KDVEGPHQGE YGTIVARLGL DVAACRQHWK
Vibrio wodanis  VPVKLVHLNK CPILAPAKTL TAEN----- ----AENLNV DRAACLKNLK
Shewanella      IGIKQIHINK SPFIAGAKSL TDEN----- ----AARLDI DKAFARDQYK
Psychromonas    PPIKLIHINK CPIVASAKTL SAER----- ----AKELGV DAKQCRQSM
Moritella viscosa IPLKLIHINK CPVLAPAKTL LPEN----- ----AERLGI DRSACLANLK
Consensus       :* :*:.* :*.* : *.* : : . *.* : : . .
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360          370          380          390          400
E. coli K12      ILRENQVRE KVVAFIAEAE PFTPSDNVDA QLYNG-FFSD ADRAAMKIVL
Halomonas       TLRDASGVAA KVAEVFSAGY D-DVPQDPDL MLYSGSFFSA ADRQMERVR
Vibrio wodanis  VIRDNPEIRQ KLIALYSIEP NYEKSTNVDT LLYDG-FFSH ADKTTIDIIR
Shewanella      RLRQHPEIRE KLVAVFDIES D-RIITDPDL QLYSGGFFSH ADKAKMEMIR
Psychromonas    TFSENKHLVE KLIAVFDTES KSSKEQPEQ KLYSGGFPTA NDKNQAKAIT
Moritella viscosa RLKESATLRE NVVGVQVER EYPKSTNVDA MIYDG-FFSA GDKANFEILR
Consensus       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
E. coli K12      ETEPRNLPAL DITFVDKRIE KLLFNRYARN FPGTLDYAEQ Q-----RWLE
Halomonas       EMEPWDLVGQ RFAFQDPRLE EMLFRFRARS YPDTLEGEER EQWEAFRWMR
Vibrio wodanis  QSTPEQLIDF EPNVSDPRIK PLLFRYRARN FPHTLNETE Q-----KWQS
Shewanella      NTKPINLAAL ELSFDDERLP EMLYRYRARN YPETLDESES I-----RWRE
Psychromonas    SLSPQIQIANY QVTFDDPNFD NLWWRYKARN YPQMLSLEE Q-----KWGR
Moritella viscosa ETAPEQLTGL QLKVSDSRFN ELFFRYRARN FPHLLSMPEQ Q-----KWLD
Consensus       . * : : . * : : : : : : : * * . * : *
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
E. coli K12      HRRQVFTPEF LQGYADELQM LVQQYADDKE KVALLKALWQ YAEIIV----
Halomonas       INDPALAGFT LKAFAREIEQ YNQQTLD-R ERQVLEELVM FVEAMMPAQA
Vibrio wodanis  HLQDYFQTH- LPEYESSFEN LYLESEGNEK KTAILRAVYN YVQQLVS---
Shewanella      FCQSRLND-- -PDYMIKLEN IIEQTEQDEV KQKLLQALCH YLRNL-----
Psychromonas    HREAYLIEH- VDNVVARLEM LVIEHQHSPE KIEVLQKLGH YLEFLTGNT-
Moritella viscosa HCRTVLEDS- APAYFARLDA LAIENSHDER KMKLLQQLYL YGQKIIGA--
Consensus       : : : : : : : : : : : : : : : :
    
```

Figura 6 (cont.)

	...
E. coli K12	---
Halomonas	FDA
Vibrio wodanis	---
Shewanella	---
Psychromonas	---
Moritella viscosa	---
Consensus	

Figura 7: Exonucleasa de *Shewanella* sp. marcada con His (aminoácido SEQ ID NO. 11; nucleótido SEQ ID NO. 16)

1	ATG AAC AAC ACT AAG AAA CAG CCA ACT TTA TTT TGG CAC GAT TAT	45
1	M N N T K K Q P T L F W H D Y	15
46	GAA ACA TTT GGT GCT AAT CCA GCC AAA GAT AGG CCA TCG CAG TTT	90
16	E T F G A N P A K D R P S Q F	30
91	GCT GGT GTG CGT ACC GAC ATG GAT CTC AAT ATC ATT GCT GAG CCT	135
31	A G V R T D M D L N I I A E P	45
136	GTC ACA TTT TAC TGT AAA GTC GCG AAT GAC TAC CTG CCC TCA CCT	180
46	V T F Y C K V A N D Y L P S P	60
181	GAA GCT ATT TTA ATT ACA GGT ATA ACA CCA CAG CTT GCT AAC CTT	225
61	E A I L I T G I T P Q L A N L	75
226	AAA GGG ATG CCT GAA GCT GAG TTT ATG GCA CAA ATC CAC CAG TTG	270
76	K G M P E A E F M A Q I H Q L	90
271	TTT AGC CAA GAA AAT ACC TGT GTT GTG GGT TAC AAC TCA ATT AGA	315
91	F S Q E N T C V V G Y N S I R	105
316	TTT GAT GAT GAA GTC TCC CGC TAT GGC TTT TAC CGT AAC TTT TTT	360
106	F D D E V S R Y G F Y R N F F	120
361	GAC CCG TAT GCT AGA GAA TGG AAA AAC GGT AAT AGT CGC TGG GAT	405
121	D P Y A R E W K N G N S R W D	135
406	ATC ATT GAT TTA GTA CGT GCT TGT TAT GCC TTT AGG CCC GAT GGA	450
136	I I D L V R A C Y A F R P D G	150
451	ATA AAC TGG CCA CAA AAA GAA GAT GGC TCT CCA AGT TTT AAA CTC	495
151	I N W P Q K E D G S P S F K L	165
496	GAA CAC TTA ACC GTT GCC AAT GGC CTT AGC CAT GAA AAA GCC CAC	540
166	E H L T V A N G L S H E K A H	180
541	GAT GCT ATG TCT GAT GTG TAT GCC ACT ATT GCG ATG GCT AAG CTT	585
181	D A M S D V Y A T I A M A K L	195
586	ATC AAA TCA GTG CAG CCT AAA TTG TTT GAA TAT TAC TTC AAT CTG	630
196	I K S V Q P K L F E Y Y F N L	210
631	CGC CGA AAA CAG GAA GTT TCG AAG CTA ATC GAC GTA CTA GAA ATG	675
211	R R K Q E V S K L I D V L E M	225
676	AAA CCG TTA GTG CAT GTA AGT TCA AAG ATT AGC GCG CTA AAT GGC	720
226	K P L V H V S S K I S A L N G	240
721	TGT ACC ACA TTA ATC GCG CCG CTG GCC TTT CAC ACG ACT AAT AAA	765
241	C T T L I A P L A F H T T N K	255
766	AAT GCG GTT ATC TGT GTC AAT TTA GCC ATG GAT GTC ACG CCG CTC	810
256	N A V I C V N L A M D V T P L	270
811	ATT GAG TTG ACC GCC GAG CAA ATT CGA GAG CGC ATG TAC ACA AGG	855
271	I E L T A E Q I R E R M Y T R	285
856	CGT GAT GAT TTA GCG GAA GAT GAG TTA CCT ATT GGC ATC AAA CAA	900
286	R D D L A E D E L P I G I K Q	300
901	ATC CAT ATC AAC AAA AGT CCA TTT ATT GCC GGT GCT AAA TCA TTA	945
301	I H I N K S P F I A G A K S L	315

Figura 7 (cont.)

946	ACC	GAT	GAA	AAT	GCC	GCT	CGT	CTT	GAT	ATT	GAT	AAA	GCA	TTT	GCA	990
316	T	D	E	N	A	A	R	L	D	I	D	K	A	F	A	330
991	AGA	GAT	CAA	TAT	AAG	CGG	CTT	AGA	CAG	CAC	CCA	GAG	ATA	CGA	GAA	1035
331	R	D	Q	Y	K	R	L	R	Q	H	P	E	I	R	E	345
1036	AAG	CTC	GTT	GCG	GTG	TTT	GAC	ATC	GAG	TCC	GAT	CGT	ATC	ATT	ACC	1080
346	K	L	V	A	V	F	D	I	E	S	D	R	I	I	T	360
1081	GAT	CCC	GAT	CTT	CAG	CTT	TAT	AGC	GGT	GGC	TTT	TTT	AGC	CAT	GCG	1125
361	D	P	D	L	Q	L	Y	S	G	G	F	F	S	H	A	375
1126	GAT	AAA	GCA	AAA	ATG	GAG	ATG	ATC	CGT	AAT	ACC	AAA	CCT	ATT	AAT	1170
376	D	K	A	K	M	E	M	I	R	N	T	K	P	I	N	390
1171	TTA	GCC	GCA	CTG	GAG	CTG	TCA	TTT	GAC	GAT	GAG	CGC	TTA	CCA	GAA	1215
391	L	A	A	L	E	L	S	F	D	D	E	R	L	P	E	405
1216	ATG	TTG	TAT	CGA	TAT	AGA	GCA	CGT	AAT	TAT	CCT	GAA	ACA	CTG	GAT	1260
406	M	L	Y	R	Y	R	A	R	N	Y	P	E	T	L	D	420
1261	GAA	TCT	GAG	AGC	ATT	CGT	TGG	CGT	GAA	TTC	TGT	CAA	TCA	AGG	CTC	1305
421	E	S	E	S	I	R	W	R	E	F	C	Q	S	R	L	435
1306	AAT	GAT	CCT	GAT	TAC	ATG	ATA	AAA	CTT	GAA	AAC	ATT	ATT	GAA	CAA	1350
436	N	D	P	D	Y	M	I	K	L	E	N	I	I	E	Q	450
1351	ACC	GAG	CAA	GAT	GAA	GTA	AAG	CAA	AAA	TTA	TTA	CAG	GCT	TTG	TGT	1395
451	T	E	Q	D	E	V	K	Q	K	L	L	Q	A	L	C	465
1396	CAT	TAT	CTT	AGA	AAT	CTT	TCT	GCA	GGC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	1440
466	H	Y	L	R	N	L	S	A	G	H	H	H	H	H	H	480
1441	TGA	1443														
481	*															

Figura 8: Exonucleasa de Halomonas sp. marcada con His (aminoácido SEQ ID NO. 12; nucleótido SEQ ID NO. 17)

1	ATG	GCA	TCA	CCC	AAT	GCT	GCC	CCT	GCC	AGT	TTT	CTC	TGG	CAT	GAT	45
1	M	A	S	P	N	A	A	P	A	S	F	L	W	H	D	15
46	TAT	GAA	ACC	TTC	GGG	GCT	GAC	CCG	CGC	CGC	GAT	CGG	CCC	GCT	CAG	90
16	Y	E	T	F	G	A	D	P	R	R	D	R	P	A	Q	30
91	TTC	GCT	GCA	CTG	CGC	ACG	GAT	GCA	GAA	CTG	AAC	GAG	ATC	GGT	GAG	135
31	F	A	A	L	R	T	D	A	E	L	N	E	I	G	E	45
136	CCC	ATC	GAG	CTC	TAC	TGC	AAA	CCC	GCC	GAT	GAC	TAC	CTG	CCT	CAT	180
46	P	I	E	L	Y	C	K	P	A	D	D	Y	L	P	H	60
181	CCT	GCT	GCC	TGT	TTG	ATC	ACC	GGT	ATT	ACC	CCT	CAA	AAA	GCC	CAG	225
61	P	A	A	C	L	I	T	G	I	T	P	Q	K	A	Q	75
226	CGC	CAT	GGT	CTC	CCC	GAA	GCA	GAG	TTC	GCG	GGT	GAG	ATT	CAG	CGC	270
76	R	H	G	L	P	E	A	E	F	A	G	E	I	Q	R	90
271	CAC	ATG	AGC	GAG	CCG	GGT	ACC	TGC	GTA	GTG	GGC	TAC	AAC	AGC	CTG	315
91	H	M	S	E	P	G	T	C	V	V	G	Y	N	S	L	105
316	CGT	TTT	GAT	GAC	GAA	GTT	TCG	CGC	CAC	CTG	TTT	TAC	CGC	AAT	TTG	360
106	R	F	D	D	E	V	S	R	H	L	F	Y	R	N	L	120
361	CTT	GAC	CCT	TAT	TCC	CGC	GAG	TGG	CAA	AAC	GGC	AAT	TCC	CGC	TGG	405
121	L	D	P	Y	S	R	E	W	Q	N	G	N	S	R	W	135
406	GAT	TTA	ATC	GAT	ATT	GTG	CGC	GCC	TTT	TAT	GCG	CTG	CGC	CCG	GAT	450
136	D	L	I	D	I	V	R	A	F	Y	A	L	R	P	D	150
451	GGC	ATT	GAA	TGG	CCG	CTG	CGC	GAA	GAC	GGT	GCA	CCC	AGC	TTT	AAG	495
151	G	I	E	W	P	L	R	E	D	G	A	P	S	F	K	165
496	CTC	GAG	CAC	TTA	ACT	GCC	GCC	AAC	GGC	ATT	GCC	CAT	GAG	GGT	GCC	540
166	L	E	H	L	T	A	A	N	G	I	A	H	E	G	A	180
541	CAC	GAT	GCG	GTG	GCA	GAT	GTC	CGC	GCT	ACT	ATC	GCC	TTG	GCG	CGG	585
181	H	D	A	V	A	D	V	R	A	T	I	A	L	A	R	195
586	TTG	CTC	AAA	GTG	CGC	AAT	GCC	AAG	CTG	TTT	GAC	TAT	CTG	CTC	GGC	630
196	L	L	K	V	R	N	A	K	L	F	D	Y	L	L	G	210
631	CTG	CGC	GGT	AAG	CGC	GCG	GTG	GCC	AAG	CAG	CTC	GAC	TTG	CCC	AAC	675
211	L	R	G	K	R	A	V	A	K	Q	L	D	L	P	N	225
676	GCC	AAA	CCG	CTG	CTG	CAT	ATC	TCC	CGC	CGT	TAT	CCT	GCT	AGC	CGG	720
226	A	K	P	L	L	H	I	S	R	R	Y	P	A	S	R	240
721	GGC	TGT	AGT	GCA	CTA	GTC	ATG	CCG	CTG	GCC	GAG	CAC	CCG	ACA	AAC	765
241	G	C	S	A	L	V	M	P	L	A	E	H	P	T	N	255
766	CCT	AAT	GGG	GTG	ATT	GTT	TAC	GAT	TTG	AGC	GTT	GAT	CCC	AGC	GAT	810
256	P	N	G	V	I	V	Y	D	L	S	V	D	P	S	D	270
811	ATG	CTG	AGC	ATG	TCG	GCG	GAG	CAA	ATT	CGT	GAG	CGG	GTG	TTT	GTC	855
271	M	L	S	M	S	A	E	Q	I	R	E	R	V	F	V	285
856	AGT	CAG	CAG	GAT	CTC	GCC	GAA	GGC	GAG	GCG	CGC	ATT	CCG	CTA	AAG	900
286	S	Q	Q	D	L	A	E	G	E	A	R	I	P	L	K	300

Figura 8 (cont.)

901	ATC	ATC	CAT	ATC	AAC	CGC	TGC	CCA	GTG	GTG	TTC	CCC	GCT	AGT	GCT	945
301	I	I	H	I	N	R	C	P	V	V	F	P	A	S	A	315
946	TTG	AAA	GAC	GTT	GAG	GGG	CCT	CAT	CAG	GGC	GAG	TAT	GGC	ACC	ATC	990
316	L	K	D	V	E	G	P	H	Q	G	E	Y	G	T	I	330
991	GTC	GCG	CGC	TTA	GGC	TTA	GAT	GTG	GCT	GCC	TGT	CGG	CAG	CAC	TGG	1035
331	V	A	R	L	G	L	D	V	A	A	C	R	Q	H	W	345
1036	AAA	ACC	CTG	CGC	GAT	GCC	AGC	GGT	GTC	GCC	GCT	AAG	GTC	GCC	GAG	1080
346	K	T	L	R	D	A	S	G	V	A	A	K	V	A	E	360
1081	GTG	TTT	AGT	GCC	GGT	TAC	GAC	GAT	GTA	CCC	CAA	GAC	CCT	GAT	CTA	1125
361	V	F	S	A	G	Y	D	D	V	P	Q	D	P	D	L	375
1126	ATG	CTC	TAT	TCG	GGC	AGT	TTC	TTC	TCC	GCT	GCT	GAC	CGT	CAG	CAG	1170
376	M	L	Y	S	G	S	F	F	S	A	A	D	R	Q	Q	390
1171	ATG	GAG	CGG	GTG	CGA	GAG	ATG	GAA	CCG	TGG	GAC	CTG	GTC	GGT	CAG	1215
391	M	E	R	V	R	E	M	E	P	W	D	L	V	G	Q	405
1216	CGC	TTT	GCG	TTT	CAG	GAT	CCG	CGT	TTG	GAA	GAG	ATG	CTG	TTT	CGC	1260
406	R	F	A	F	Q	D	P	R	L	E	E	M	L	F	R	420
1261	TTT	CGT	GCG	CGC	AGT	TAC	CCC	GAC	ACG	TTG	GAA	GGC	GAA	GAG	CGC	1305
421	F	R	A	R	S	Y	P	D	T	L	E	G	E	E	R	435
1306	GAG	CAG	TGG	GAG	GCG	TTT	CGC	TGG	ATG	CGG	ATC	AAT	GAC	CCG	GCC	1350
436	E	Q	W	E	A	F	R	W	M	R	I	N	D	P	A	450
1351	TTG	GCG	GGC	TTT	ACG	CTT	AAG	GCG	TTT	GCG	CGG	GAA	ATC	GAG	CAG	1395
451	L	A	G	F	T	L	K	A	F	A	R	E	I	E	Q	465
1396	TAC	AAT	CAG	CAA	ACC	CTC	ACT	GAT	CGC	GAG	CGG	CAG	GTT	CTG	GAA	1440
466	Y	N	Q	Q	T	L	T	D	R	E	R	Q	V	L	E	480
1441	GAG	CTG	GTG	ATG	TTC	GTG	GAA	GCC	ATG	ATG	CCG	GCC	CAG	GCA	TTT	1485
481	E	L	V	M	F	V	E	A	M	M	P	A	Q	A	F	495
1486	GAT	GCC	TCT	GCA	GGC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA			1521	
496	D	A	S	A	G	H	H	H	H	H	H	*				

Figura 9: Exonucleasa de *Vibrio wodanis* marcada con His (aminoácido SEQ ID NO. 13; nucleótido SEQ ID NO. 18)

1	ATG	CCG	CAG	GAT	AAC	GCA	CCA	AGT	TTC	TTC	TTT	TTT	GAT	TAT	GAA	45
1	M	P	Q	D	N	A	P	S	F	F	F	F	D	Y	E	15
46	ACA	TGG	GGA	ACT	AGC	CCA	TCT	CTC	GAT	CGC	CCA	TGC	CAA	TTT	GCT	90
16	T	W	G	T	S	P	S	L	D	R	P	C	Q	F	A	30
91	GGA	GTT	CGT	ACC	GAT	GAA	GAT	TTC	AAT	ATC	ATT	GGT	GAG	CCA	TTA	135
31	G	V	R	T	D	E	D	F	N	I	I	G	E	P	L	45
136	GTT	ATT	TAC	TGT	CGC	CCT	CCA	ATT	GAT	TAT	TTA	CCT	TCT	CCT	GAA	180
46	V	I	Y	C	R	P	P	I	D	Y	L	P	S	P	E	60
181	GCC	TGT	TTA	ATT	ACT	GGC	ATC	ACG	CCA	CAA	ACT	GCG	GTA	AAT	AAA	225
61	A	C	L	I	T	G	I	T	P	Q	T	A	V	N	K	75
226	GGC	CTG	TCT	GAG	CCT	GAG	TTC	ATT	ACT	CAA	ATC	CAT	AAC	GAA	TTA	270
76	G	L	S	E	P	E	F	I	T	Q	I	H	N	E	L	90
271	TCA	AAA	CCA	AAT	ACT	TGC	TCG	CTA	GGC	TAT	AAC	AAC	ATT	CGT	TTT	315
91	S	K	P	N	T	C	S	L	G	Y	N	N	I	R	F	105
316	GAT	GAT	GAA	GTT	TCT	CGC	TAC	ACC	TTA	TAT	CGT	AAC	TTC	TTT	GAA	360
106	D	D	E	V	S	R	Y	T	L	Y	R	N	F	F	E	120
361	CCG	TAT	GGC	TGG	AGC	TGG	CAA	AAC	GGC	AAC	TCG	CGT	TGG	GAT	CTA	405
121	P	Y	G	W	S	W	Q	N	G	N	S	R	W	D	L	135
406	CTT	GAT	GTA	ATG	CGT	GCT	GTG	TAT	GCT	CTG	CGT	CCT	GAA	GGC	ATT	450
136	L	D	V	M	R	A	V	Y	A	L	R	P	E	G	I	150
451	AAA	TGG	CCA	AAA	GAC	GAA	GAA	GGC	AAA	CCA	AGC	TTT	AGA	TTA	GAA	495
151	K	W	P	K	D	E	E	G	K	P	S	F	R	L	E	165
496	AAA	CTC	TCG	CAA	GCA	AAT	GGC	ATT	GAA	CAT	GAA	AAT	GCC	CAC	GAT	540
166	K	L	S	Q	A	N	G	I	E	H	E	N	A	H	D	180
541	GCG	ATG	GCC	GAT	GTT	ATT	GCC	ACC	ATC	GAG	TTA	GCT	AAA	GTC	GTT	585
181	A	M	A	D	V	I	A	T	I	E	L	A	K	V	V	195
586	AAA	AAA	GCA	CAA	CCT	AAA	ATG	TTT	AAC	TAC	CTG	CTT	TCT	ATG	CGT	630
196	K	K	A	Q	P	K	M	F	N	Y	L	L	S	M	R	210
631	CAT	AAA	AAG	AAA	GCG	GCA	ACG	TTA	ATC	GAT	ATT	GTT	GAA	ATG	ACA	675
211	H	K	K	K	A	A	T	L	I	D	I	V	E	M	T	225
676	CCG	TTA	ATG	CAC	GTG	TCT	GGT	ATG	TTT	GGC	GTA	GAT	AGA	GGC	AAT	720
226	P	L	M	H	V	S	G	M	F	G	V	D	R	G	N	240
721	ATT	AGT	TGG	ATT	GTG	CCT	GTT	GCT	TGG	CAT	CCT	ACC	AAT	AAC	AAC	765
241	I	S	W	I	V	P	V	A	W	H	P	T	N	N	N	255
766	GCC	GTC	ATT	ACG	ATT	GAT	TTA	GCG	TTA	GAC	CCA	AGT	GTG	TTC	CTA	810
256	A	V	I	T	I	D	L	A	L	D	P	S	V	F	L	270
811	GAA	TTA	GAT	GCA	GAG	CAA	TTA	CAT	CAA	CGC	ATG	TAT	ACC	AAA	CGT	855
271	E	L	D	A	E	Q	L	H	Q	R	M	Y	T	K	R	285
856	GCT	GAT	CTA	GCC	CCT	GAC	GAA	TTG	CCT	GTT	CCT	GTA	AAA	TTA	GTA	900
286	A	D	L	A	P	D	E	L	P	V	P	V	K	L	V	300

Figura 9 (cont.)

901	CAT	TTA	AAC	AAG	TGC	CCT	ATT	CTT	GCG	CCT	GCT	AAA	ACA	TTG	ACG	945
301	H	L	N	K	C	P	I	L	A	P	A	K	T	L	T	315
946	GCT	GAG	AAT	GCT	GAA	AAT	CTA	AAT	GTG	GAC	AGA	GCC	GCC	TGT	TTA	990
316	A	E	N	A	E	N	L	N	V	D	R	A	A	C	L	330
991	AAA	AAT	CTT	AAA	GTG	ATC	CGT	GAT	AAC	CCT	GAG	ATC	AGA	CAA	AAG	1035
331	K	N	L	K	V	I	R	D	N	P	E	I	R	Q	K	345
1036	CTA	ATT	GCG	CTT	TAC	AGC	ATT	GAG	CCT	AAT	TAT	GAG	AAA	TCA	ACC	1080
346	L	I	A	L	Y	S	I	E	P	N	Y	E	K	S	T	360
1081	AAT	GTA	GAT	ACC	CTT	CTA	TAT	GAT	GGT	TTC	TTC	TCT	CAT	GCT	GAT	1125
361	N	V	D	T	L	L	Y	D	G	F	F	S	H	A	D	375
1126	AAA	ACG	ACG	ATT	GAT	ATT	ATC	CGT	CAG	TCA	ACG	CCT	GAG	CAG	CTT	1170
376	K	T	T	I	D	I	I	R	Q	S	T	P	E	Q	L	390
1171	ATC	GAT	TTT	GAA	CCA	AAT	GTC	AGT	GAC	CCA	CGC	ATT	AAA	CCT	CTA	1215
391	I	D	F	E	P	N	V	S	D	P	R	I	K	P	L	405
1216	TTA	TTC	CGC	TAT	CGT	GCG	CGC	AAT	TTC	CCG	CAT	ACG	CTT	AAT	GAG	1260
406	L	F	R	Y	R	A	R	N	F	P	H	T	L	N	E	420
1261	ACA	GAG	CAA	CTG	AAA	TGG	CAA	TCA	CAT	TTA	CAA	GAT	TAC	TTC	CAA	1305
421	T	E	Q	L	K	W	Q	S	H	L	Q	D	Y	F	Q	435
1306	ACT	CAT	TTA	CCT	GAA	TAC	GAA	TCA	AGC	TTT	GAG	AAT	TTA	TAT	CTT	1350
436	T	H	L	P	E	Y	E	S	S	F	E	N	L	Y	L	450
1351	GAA	TCT	GAA	GGC	AAT	GAG	AAA	AAG	ACT	GCG	ATC	CTT	CGC	GCC	GTT	1395
451	E	S	E	G	N	E	K	K	T	A	I	L	R	A	V	465
1396	TAT	AAT	TAC	GTA	CAA	CAG	TTA	GTA	TCA	TCT	GCA	GGC	CAT	CAC	CAT	1440
466	Y	N	Y	V	Q	Q	L	V	S	S	A	G	H	H	H	480
1441	CAC	CAT	CAC	TGA	1452											
481	H	H	H	*												

Figura 10: Exonucleasa de *Psychromonas* sp. marcada con His (aminoácido SEQ ID NO. 14; nucleótido SEQ ID NO. 19)

1	ATG	AAT	CAA	GAA	TCC	CCA	AGC	CTT	CTT	TGG	CAC	GAT	TAT	GAA	ACC	45
1	M	N	Q	E	S	P	S	L	L	W	H	D	Y	E	T	15
46	TTC	GGG	TTA	AAC	CCA	GGA	ACG	GAT	CGC	CCT	TCT	CAG	TTT	GCA	GGC	90
16	F	G	L	N	P	G	T	D	R	P	S	Q	F	A	G	30
91	ATT	CGT	ACT	GAT	CTT	GAT	TTA	AAT	ATC	ATT	TCT	GAG	CCT	TAT	CAA	135
31	I	R	T	D	L	D	L	N	I	I	S	E	P	Y	Q	45
136	TGG	TAC	TGC	AGA	CCA	CCC	AAC	GAT	TAT	TTA	CCT	GCT	CCT	GAA	GCG	180
46	W	Y	C	R	P	P	N	D	Y	L	P	A	P	E	A	60
181	TGT	TTA	GTA	ACG	GGA	ATA	ACA	CCA	CAA	TAT	GCG	TTG	CAA	CAT	GGT	225
61	C	L	V	T	G	I	T	P	Q	Y	A	L	Q	H	G	75
226	GAA	TTT	GAA	AAC	CAA	TTT	ATA	TTT	AAT	ATA	TTG	CAG	CAA	TTC	CAA	270
76	E	F	E	N	Q	F	I	F	N	I	L	Q	Q	F	Q	90
271	CAG	CAA	AAC	ACG	TGC	GTT	GTT	GGG	TAT	AAC	AAT	ATT	CGC	TTT	GAT	315
91	Q	Q	N	T	C	V	V	G	Y	N	N	I	R	F	D	105
316	GAT	GAA	GTC	ACA	CGC	TTT	ACT	TTG	TAT	CGT	AAT	TTT	CAT	GAC	CCT	360
106	D	E	V	T	R	F	T	L	Y	R	N	F	H	D	P	120
361	TAT	CAA	AGA	GAA	TGG	CAA	AAT	GGC	TGC	TCT	CGC	TGG	GAC	ATT	ATT	405
121	Y	Q	R	E	W	Q	N	G	C	S	R	W	D	I	I	135
406	GAC	ATG	GTT	CGC	GCT	TGC	TAT	GCA	CTC	AGA	CCA	GAA	GGT	ATT	GAA	450
136	D	M	V	R	A	C	Y	A	L	R	P	E	G	I	E	150
451	TGG	GTA	TTT	GAT	GAA	AAT	GAT	GCG	CCA	AGT	TTT	AAA	CTT	GAG	TTA	495
151	W	V	F	D	E	N	D	A	P	S	F	K	L	E	L	165
496	TTA	ACT	AAA	GCT	AAT	GAC	ATT	GTT	CAT	CAG	CAA	GCA	CAT	GAT	GCG	540
166	L	T	K	A	N	D	I	V	H	Q	Q	A	H	D	A	180
541	ATG	TCG	GAT	GTT	TAT	GCC	ACT	ATC	GCC	ATG	GCA	AAA	CTA	ATT	AAG	585
181	M	S	D	V	Y	A	T	I	A	M	A	K	L	I	K	195
586	ACA	GCA	CAT	CCA	AAG	CTA	TAT	GAC	TAT	TGT	TAT	AGT	TTG	AGA	CAA	630
196	T	A	H	P	K	L	Y	D	Y	C	Y	S	L	R	Q	210
631	AAA	AAT	AAA	GTA	TTA	AAC	GAA	CTG	AAG	CTT	GGT	ACA	TTT	AAA	CCT	675
211	K	N	K	V	L	N	E	L	K	L	G	T	F	K	P	225
676	TTA	GTT	CAT	ATC	TCT	GGT	ATG	TTT	TCT	GCG	ATG	CAA	GGC	TGT	TGT	720
226	L	V	H	I	S	G	M	F	S	A	M	Q	G	C	C	240
721	TCT	TAT	ATT	TTA	CCT	ATC	GCA	CAA	CAC	CCA	AGT	AAC	AAT	AAT	GCA	765
241	S	Y	I	L	P	I	A	Q	H	P	S	N	N	N	A	255
766	GTG	ATA	GTG	CTT	GAT	TTA	AAT	AAA	GAT	ATT	TCA	CAA	CTT	TTA	TCG	810
256	V	I	V	L	D	L	N	K	D	I	S	Q	L	L	S	270
811	TTG	AGT	GTT	GAA	GAT	ATC	CAA	TCT	TAC	TTA	TAT	ACC	GCT	ACG	GAT	855
271	L	S	V	E	D	I	Q	S	Y	L	Y	T	A	T	D	285

Figura 10 (cont.)

856	AAT	TTA	CCA	GAG	GGT	ATT	AAT	AGA	CCC	CCT	ATT	AAA	TTA	ATC	CAT	900
286	N	L	P	E	G	I	N	R	P	P	I	K	L	I	H	300
901	ATT	AAT	AAA	TGC	CCT	ATC	GTA	GCA	AGT	GCA	AAA	ACA	TTA	AGT	GCA	945
301	I	N	K	C	P	I	V	A	S	A	K	T	L	S	A	315
946	GAG	AGA	GCA	AAA	GAA	TTA	GGG	GTT	GAT	GCA	AAA	CAA	TGC	CGT	CAA	990
316	E	R	A	K	E	L	G	V	D	A	K	Q	C	R	Q	330
991	TCA	ATG	GAT	ACG	TTC	TCA	GAA	AAT	AAA	CAT	TTG	GTT	GAG	AAA	CTG	1035
331	S	M	D	T	F	S	E	N	K	H	L	V	E	K	L	345
1036	ATT	GCA	GTG	TTT	GAC	ACT	GAA	TCC	AAA	AGC	AGC	AAG	GAA	CAA	CAA	1080
346	I	A	V	F	D	T	E	S	K	S	S	K	E	Q	Q	360
1081	CCA	GAA	CAA	AAA	TTG	TAT	TCT	GGC	GGT	TTC	CCT	ACT	GCT	AAC	GAC	1125
361	P	E	Q	K	L	Y	S	G	G	F	P	T	A	N	D	375
1126	AAA	AAT	CAA	GCA	AAA	GCG	ATC	ACC	AGT	TTG	TCG	CCA	CAA	CAA	ATT	1170
376	K	N	Q	A	K	A	I	T	S	L	S	P	Q	Q	I	390
1171	GCT	AAT	TAC	CAA	GTT	ACT	TTT	GAT	GAT	CCT	AAT	TTT	GAT	AAT	TTA	1215
391	A	N	Y	Q	V	T	F	D	D	P	N	F	D	N	L	405
1216	TGG	TGG	CGA	TAC	AAA	GCA	AGA	AAT	TAT	CCG	CAA	ATG	TTA	TCA	CTT	1260
406	W	W	R	Y	K	A	R	N	Y	P	Q	M	L	S	L	420
1261	GAA	GAG	CAA	CAA	AAA	TGG	GGT	AGA	CAC	AGA	GAA	GCT	TAT	CTT	ATT	1305
421	E	E	Q	Q	K	W	G	R	H	R	E	A	Y	L	I	435
1306	GAA	CAT	GTA	GAT	AAT	TAT	GTT	GCA	CGC	TTA	GAA	ATG	CTA	GTG	ATT	1350
436	E	H	V	D	N	Y	V	A	R	L	E	M	L	V	I	450
1351	GAG	CAT	CAA	CAT	AGC	CCA	GAA	AAG	ATC	GAA	GTA	TTG	CAA	AAA	CTG	1395
451	E	H	Q	H	S	P	E	K	I	E	V	L	Q	K	L	465
1396	GGA	CAT	TAC	TTA	GAG	TTT	TTG	ACA	GGG	AAT	ACA	TCT	GCA	GGC	CAT	1440
466	G	H	Y	L	E	F	L	T	G	N	T	S	A	G	H	480
1441	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA										1455
481	H	H	H	H	H	*										

Figura 11: Exonucleasa de Moritella viscosa marcada con His (aminoácido SEQ ID NO. 15; nucleótido SEQ ID NO. 20)

1	ATG	GAT	AAC	AAT	TCG	AAC	AAA	ACA	GCA	ACA	GAT	CTG	CCC	ACT	TTT	45
1	M	D	N	N	S	N	K	T	A	T	D	L	P	T	F	15
46	TAC	TGG	CAT	GAT	TAT	GAG	ACT	TTT	GGC	TTA	AGT	CCG	TCA	CTG	GAT	90
16	Y	W	H	D	Y	E	T	F	G	L	S	P	S	L	D	30
91	CGC	CCT	TCT	CAA	TTT	GCT	GGT	ATT	CGC	ACC	GAC	ATG	GAC	TTT	AAT	135
31	R	P	S	Q	F	A	G	I	R	T	D	M	D	F	N	45
136	GTG	ATC	GGC	GAA	CCA	GAT	ATG	TTT	TAC	TGC	CGC	CAA	TCA	GAT	GAT	180
46	V	I	G	E	P	D	M	F	Y	C	R	Q	S	D	D	60
181	TAC	CTT	CCT	TCG	CCA	GAA	GCT	GCC	ATG	ATT	ACT	GGG	ATA	ACA	CCT	225
61	Y	L	P	S	P	E	A	A	M	I	T	G	I	T	P	75
226	CAA	AAG	ACC	CAA	GCA	GAA	GGT	GTA	AGT	GAA	GCA	GAG	TTC	AGT	AAA	270
76	Q	K	T	Q	A	E	G	V	S	E	A	E	F	S	K	90
271	CGT	ATT	GAA	GCG	CAA	TTC	AGT	CAA	AAA	AAC	ACC	TGT	ATC	ATT	GGT	315
91	R	I	E	A	Q	F	S	Q	K	N	T	C	I	I	G	105
316	TAT	AAC	AAC	ATT	CGC	TTT	GAT	GAT	GAA	GTA	ACA	CGT	AAT	ATC	TTC	360
106	Y	N	N	I	R	F	D	D	E	V	T	R	N	I	F	120
361	TAC	CGT	AAT	TTC	TAC	GAC	CCA	TAC	GCA	CAC	ACC	TGG	AAA	GAT	GGT	405
121	Y	R	N	F	Y	D	P	Y	A	H	T	W	K	D	G	135
406	AAT	TCG	CGC	TGG	GAT	ATT	ATT	GAC	TTG	ATG	CGC	GCT	TGT	TAT	GCT	450
136	N	S	R	W	D	I	I	D	L	M	R	A	C	Y	A	150
451	CTG	CGC	CCT	GAA	GGT	ATT	GTA	TGG	CCA	GAA	AAT	GAT	GAT	GGT	CTA	495
151	L	R	P	E	G	I	V	W	P	E	N	D	D	G	L	165
496	CCA	AGT	ATG	CGT	CTT	GAA	TTA	TTA	ACC	GCC	GCA	AAT	GGC	ATT	GAG	540
166	P	S	M	R	L	E	L	L	T	A	A	N	G	I	E	180
541	CAC	GCT	AAT	GCC	CAT	GAT	GCT	ACT	TCT	GAT	GTA	TAT	GCA	ACT	ATC	585
181	H	A	N	A	H	D	A	T	S	D	V	Y	A	T	I	195
586	GCG	ATG	GCG	AAG	CTA	GTT	AAA	GAA	AAA	CAA	CCT	AAG	CTG	TTT	GAT	630
196	A	M	A	K	L	V	K	E	K	Q	P	K	L	F	D	210
631	TTC	TTA	TTT	AAC	CTA	CGT	AGC	AAA	CGT	AAA	GTT	GAA	TCC	TTG	GTT	675
211	F	L	F	N	L	R	S	K	R	K	V	E	S	L	V	225
676	GAT	ATC	ATC	AAC	ATG	ACA	CCA	TTA	GTG	CAT	GTA	AGC	GGC	ATG	TTT	720
226	D	I	I	N	M	T	P	L	V	H	V	S	G	M	F	240
721	GGT	GCA	GAT	CGC	GGA	TTC	ACA	AGC	TGG	GTA	GTG	CCA	CTG	GCT	TGG	765
241	G	A	D	R	G	F	T	S	W	V	V	P	L	A	W	255
766	CAC	CCA	ACC	AAC	AAC	AAC	GCT	GTG	ATT	GTA	GCT	GAC	TTA	GCC	CAA	810
256	H	P	T	N	N	N	A	V	I	V	A	D	L	A	Q	270
811	GAC	ATT	ACG	CCA	TTA	TTA	GAA	TTG	AGC	GCG	GAT	GAA	CTG	CGC	GAA	855
271	D	I	T	P	L	L	E	L	S	A	D	E	L	R	E	285
856	CGT	TTA	TAT	ACG	CCA	AAG	AAA	GAT	CTC	GGT	GAC	TTA	ACC	CCT	ATC	900
286	R	L	Y	T	P	K	K	D	L	G	D	L	T	P	I	300
901	CCG	CTG	AAA	CTT	ATT	CAT	ATC	AAC	AAG	TGT	CCA	GTA	CTC	GCG	CCA	945
301	P	L	K	L	I	H	I	N	K	C	P	V	L	A	P	315

Figura 11 (cont.)

946	GCG	AAA	ACT	CTA	TTA	CCT	GAA	AAC	GCA	GAA	CGT	TTA	GGG	ATT	GAT	990
316	A	K	T	L	L	P	E	N	A	E	R	L	G	I	D	330
991	CGC	AGC	GCC	TGC	CTC	GCA	AAC	CTA	AAA	CGT	TTA	AAA	GAA	AGC	GCA	1035
331	R	S	A	C	L	A	N	L	K	R	L	K	E	S	A	345
1036	ACA	CTG	CGT	GAA	AAT	GTT	GTG	GGT	GTT	TAT	CAA	GTA	GAA	CGT	GAA	1080
346	T	L	R	E	N	V	V	G	V	Y	Q	V	E	R	E	360
1081	TAT	CCA	AAA	TCA	ACC	AAT	GTG	GAT	GCA	ATG	ATC	TAC	GAT	GGT	TTC	1125
361	Y	P	K	S	T	N	V	D	A	M	I	Y	D	G	F	375
1126	TTT	AGT	GCA	GGT	GAT	AAA	GCA	AAC	TTT	GAA	ATA	CTA	CGT	GAA	ACA	1170
376	F	S	A	G	D	K	A	N	F	E	I	L	R	E	T	390
1171	GCA	CCA	GAG	CAA	CTT	ACA	GGA	CTG	CAA	CTG	AAA	GTC	AGT	GAT	TCG	1215
391	A	P	E	Q	L	T	G	L	Q	L	K	V	S	D	S	405
1216	CGT	TTT	AAT	GAA	TTA	TTC	TTC	CGC	TAT	CGA	GCA	CGT	AAC	TTC	CCG	1260
406	R	F	N	E	L	F	F	R	Y	R	A	R	N	F	P	420
1261	CAT	TTA	TTA	TCA	ATG	CCT	GAG	CAA	CAA	AAA	TGG	CTT	GAC	CAC	TGC	1305
421	H	L	L	S	M	P	E	Q	Q	K	W	L	D	H	C	435
1306	CGA	ACT	GTG	CTA	GAA	GAC	AGT	GCC	CCA	GCC	TAT	TTT	GCA	CGT	TTA	1350
436	R	T	V	L	E	D	S	A	P	A	Y	F	A	R	L	450
1351	GAT	GCA	TTA	GCG	ATC	GAA	AAC	AGC	CAT	GAC	GAG	CGA	AAA	ATG	AAA	1395
451	D	A	L	A	I	E	N	S	H	D	E	R	K	M	K	465
1396	CTA	CTT	CAA	CAG	TTA	TAC	CTT	TAT	GGT	CAA	AAA	ATA	ATT	GGC	GCA	1440
466	L	L	Q	Q	L	Y	L	Y	G	Q	K	I	I	G	A	480
1441	TCT	GCA	GGC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA					1470	
481	S	A	G	H	H	H	H	H	H	*						

Figura 12a

Exo-I-LC (Ha)

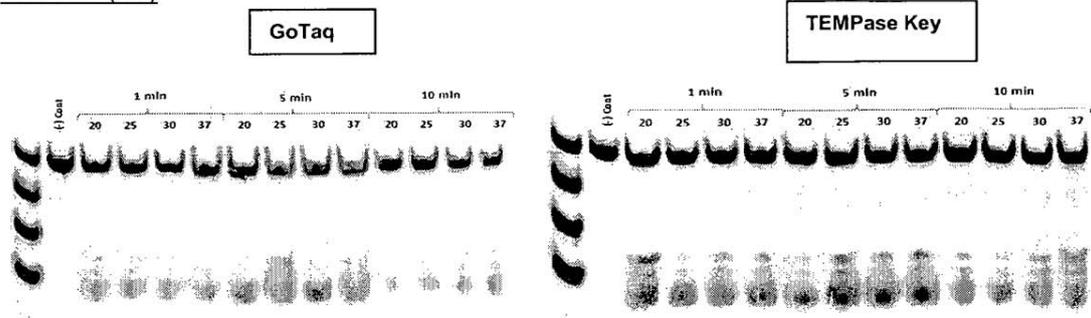


Figura 12b

Exo-I-LC (Ps)

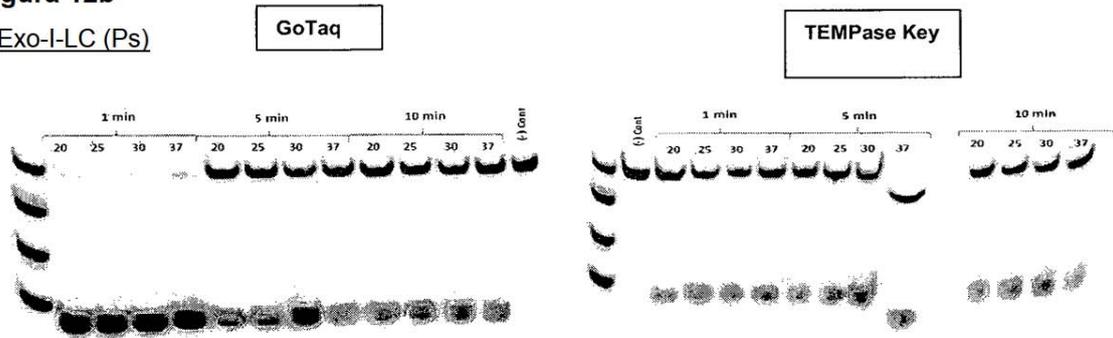


Figura 12c

Exo-I-LC (Sh)

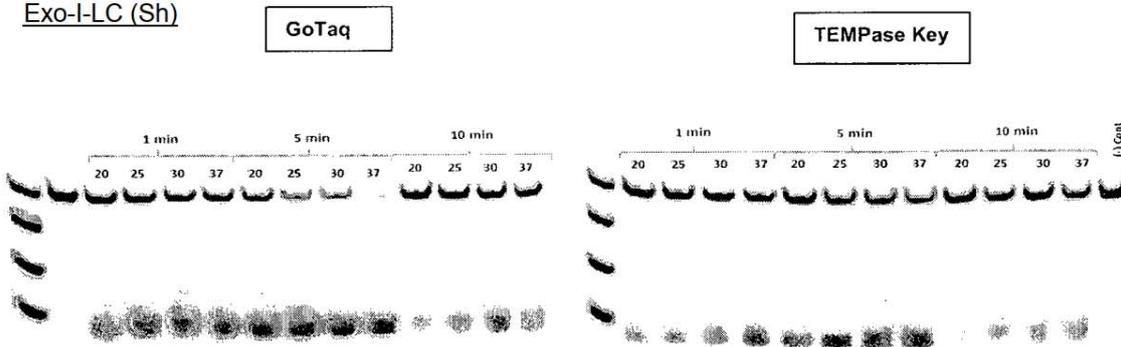


Figura 12d

Exo-I-LC (Mv)

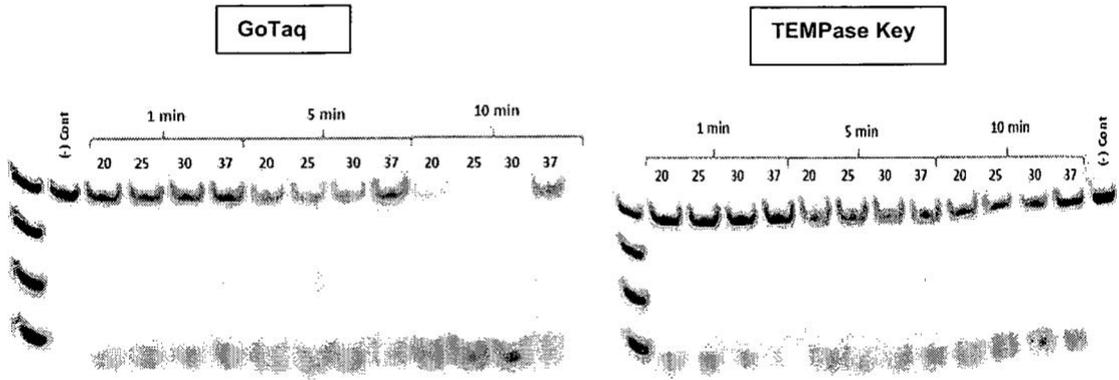


Figura 13

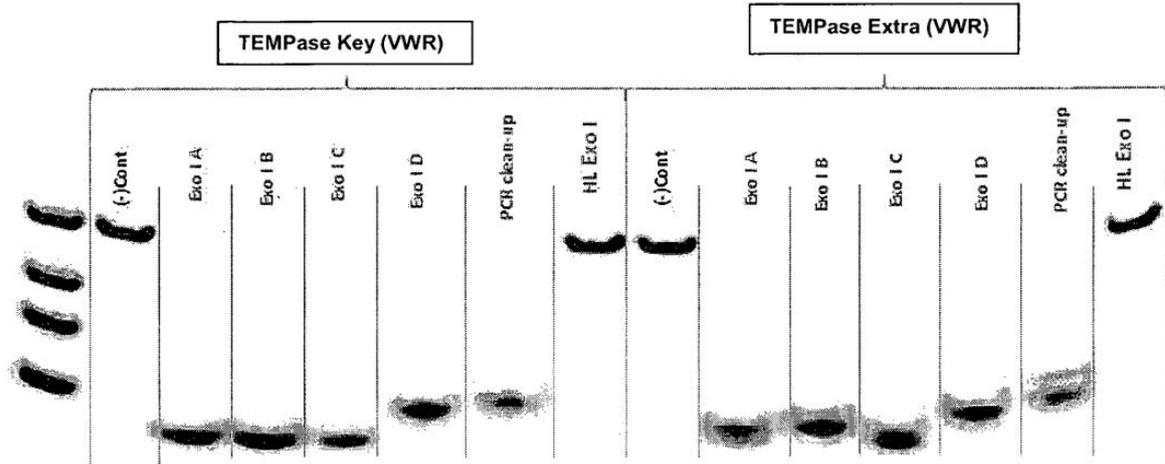
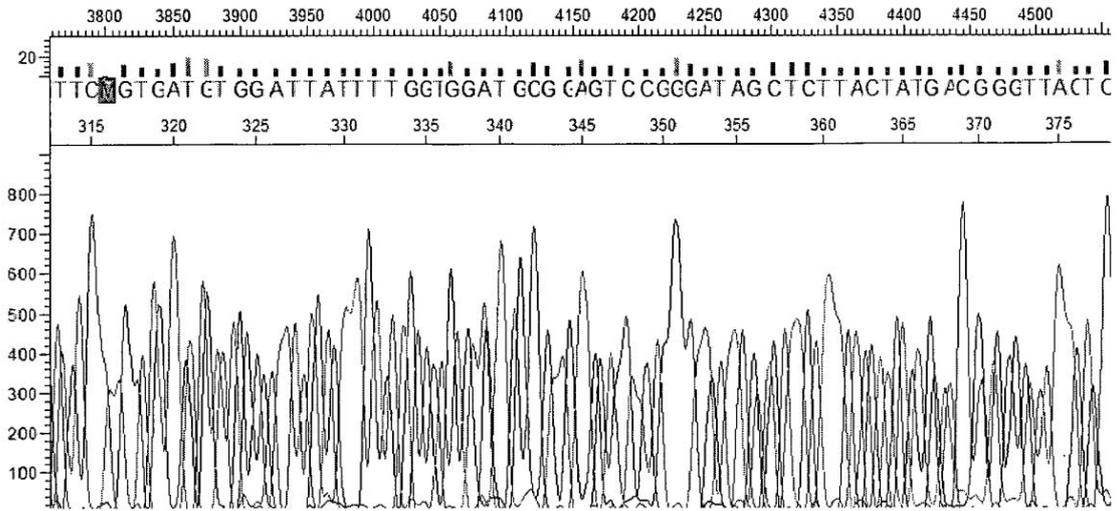
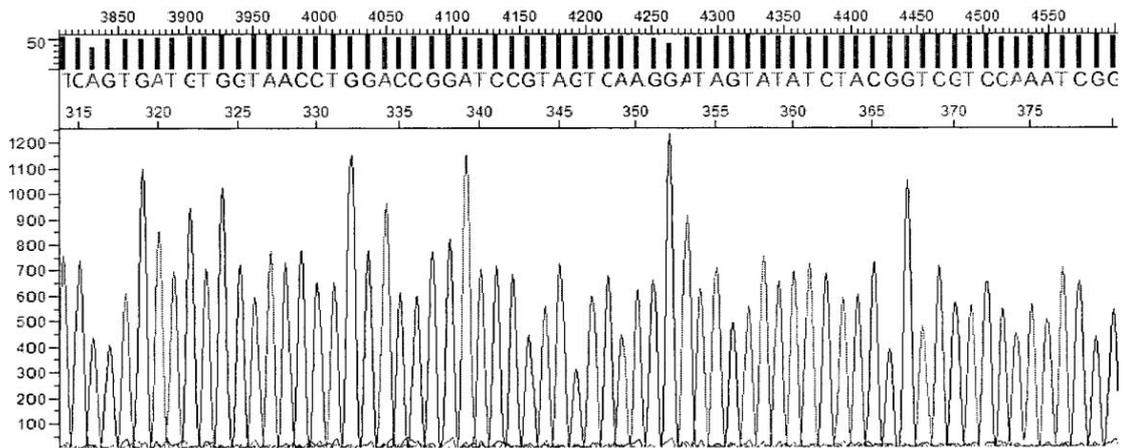


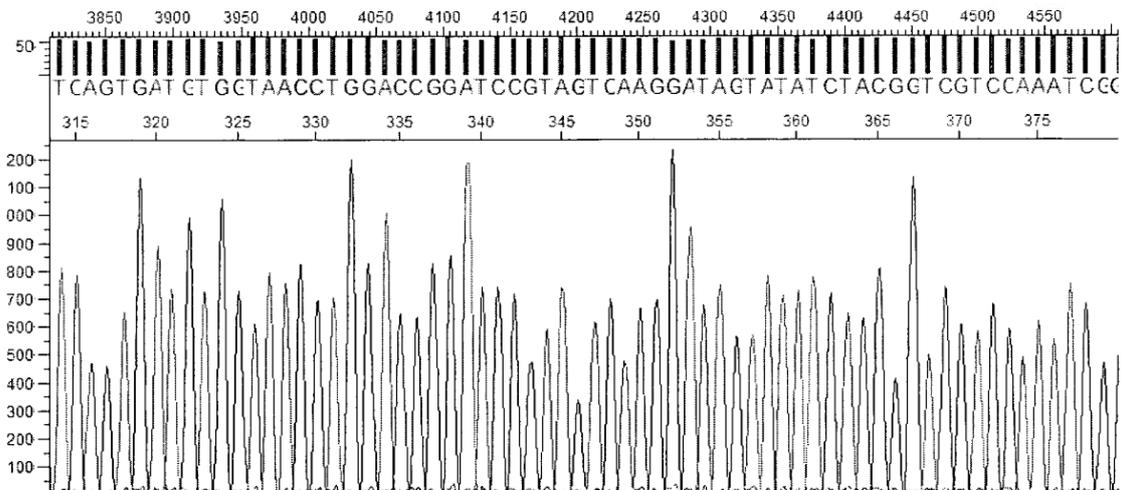
Figura 14a



Control negativo

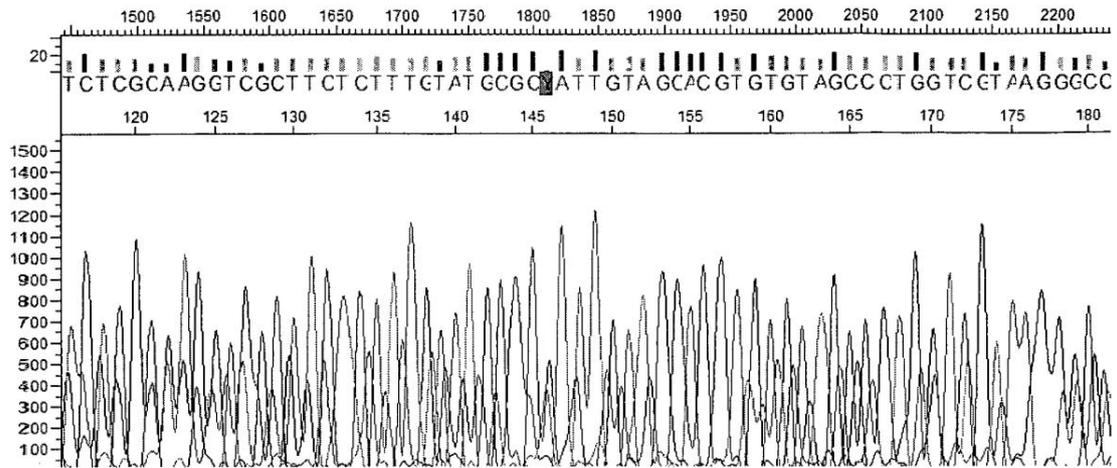


ExoSAP-IT

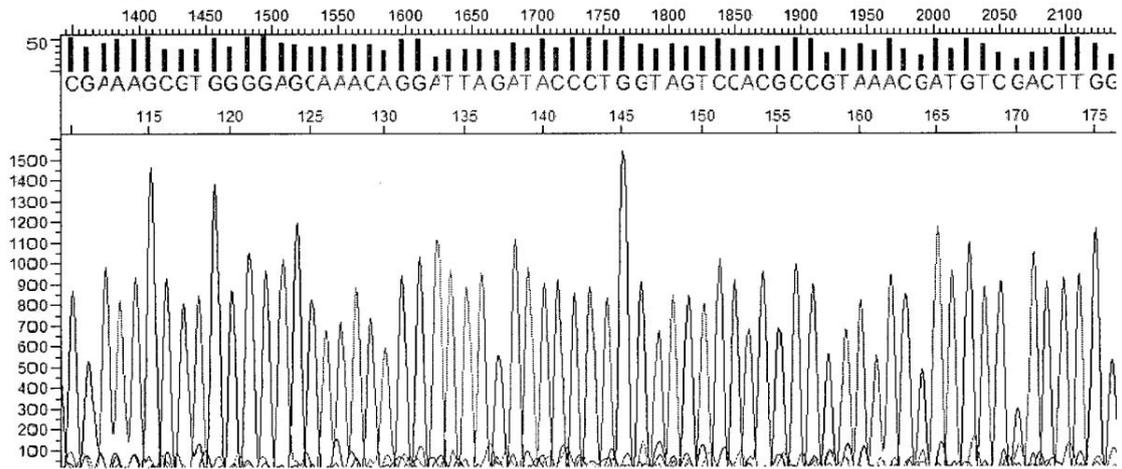


Exo-I-LC (Sh)/SAP

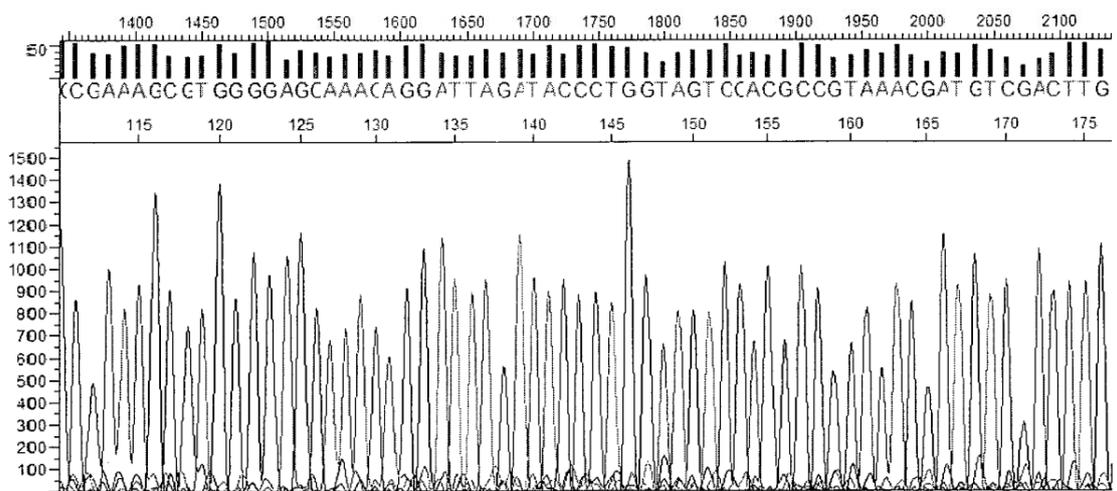
Figura 14b



Control negativo

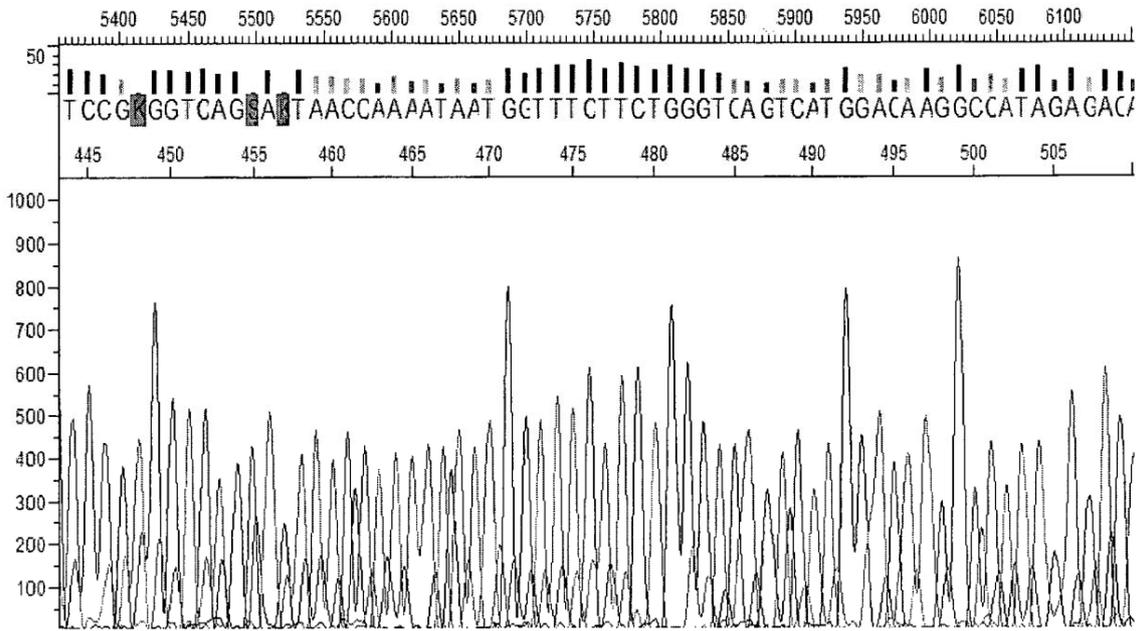


ExoSAP-IT

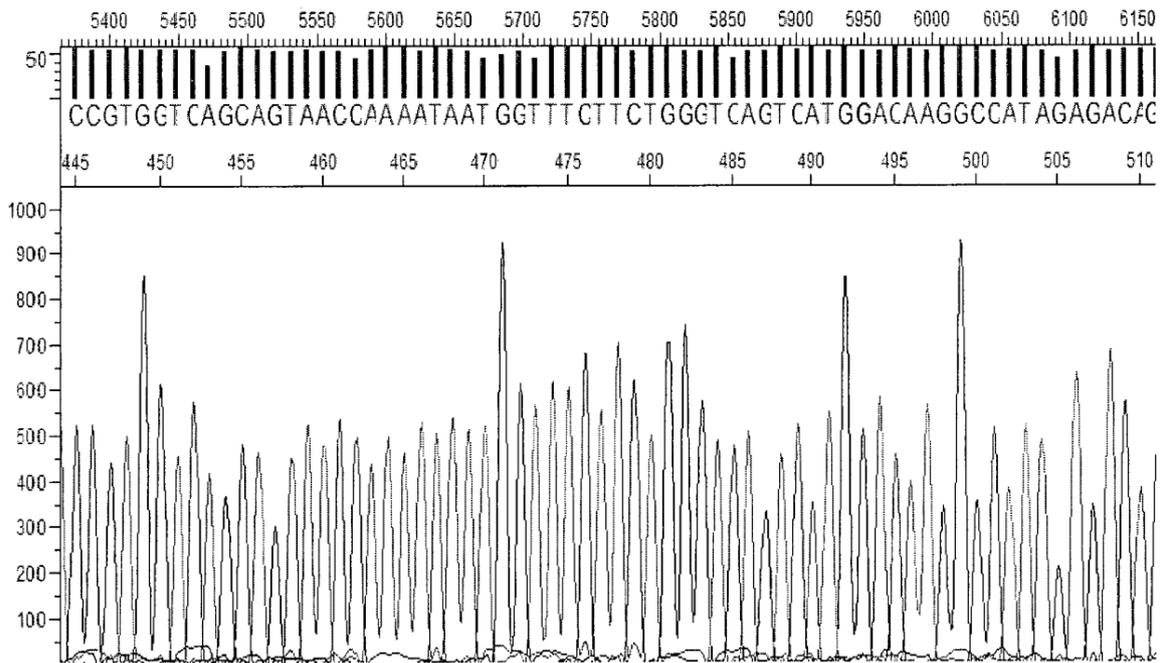


Exo-I-LC (Sh)/SAP)

Figura 14c



ExoSAP-IT



Exo-I-LC (Sh)/SAP

Figura 15a

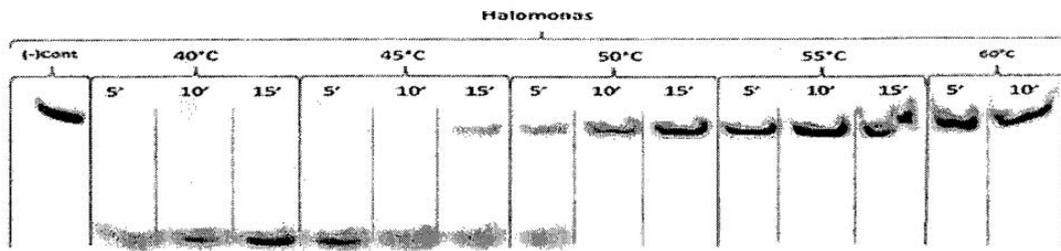


Figura 15b

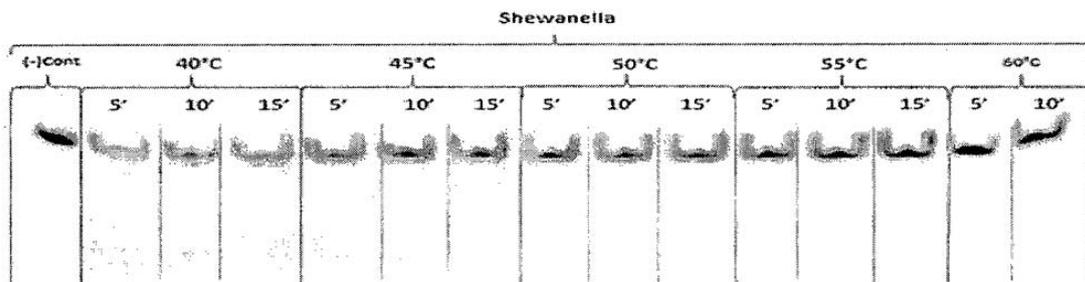


Figura 15c

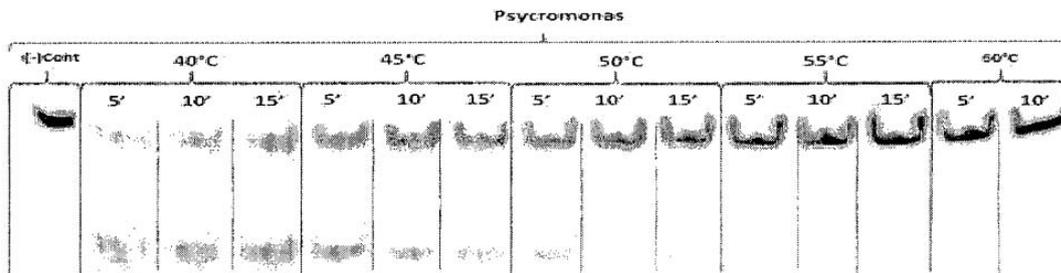


Figura 15d

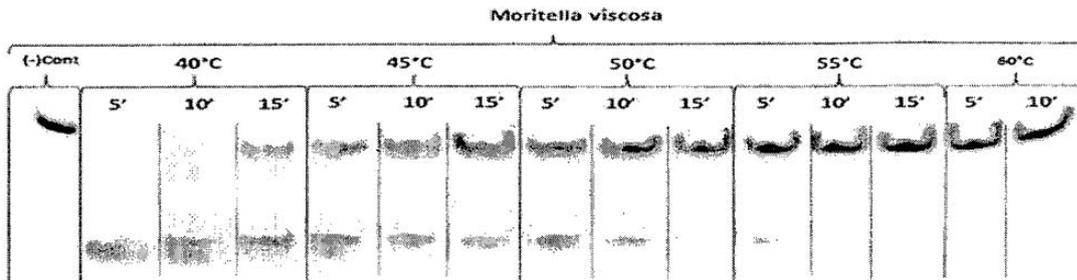


Figura 15e

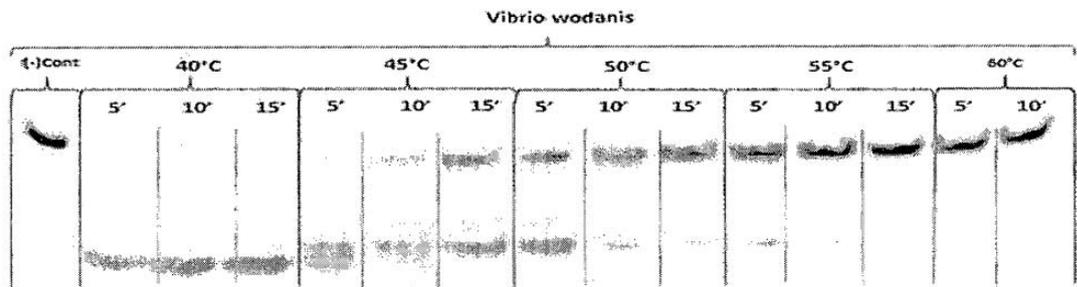


Figura 16a

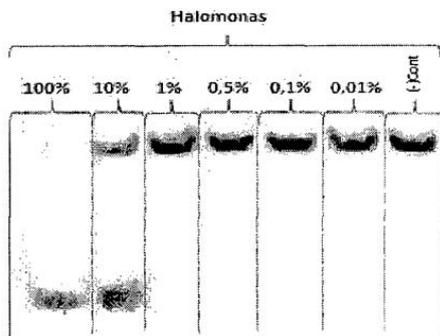


Figura 16b

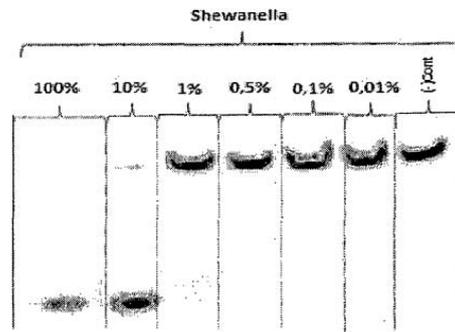


Figura 16c

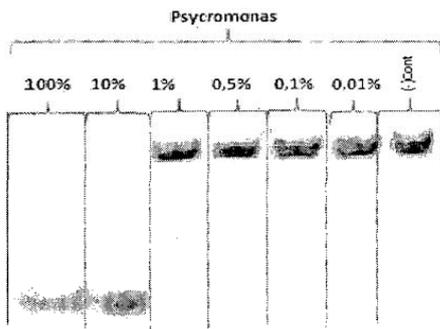


Figura 16d

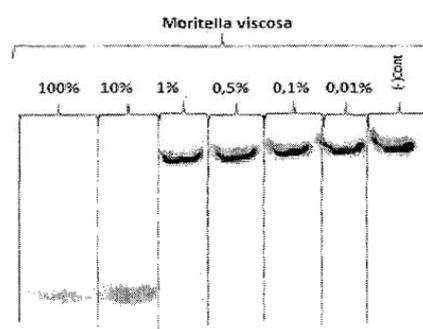


Figura 16e

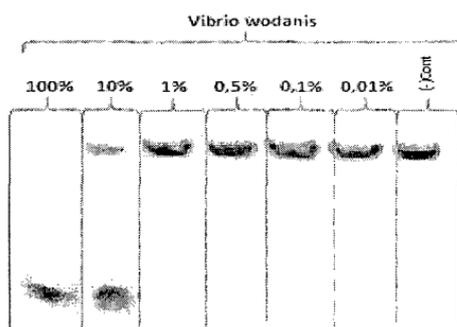


Figura 17

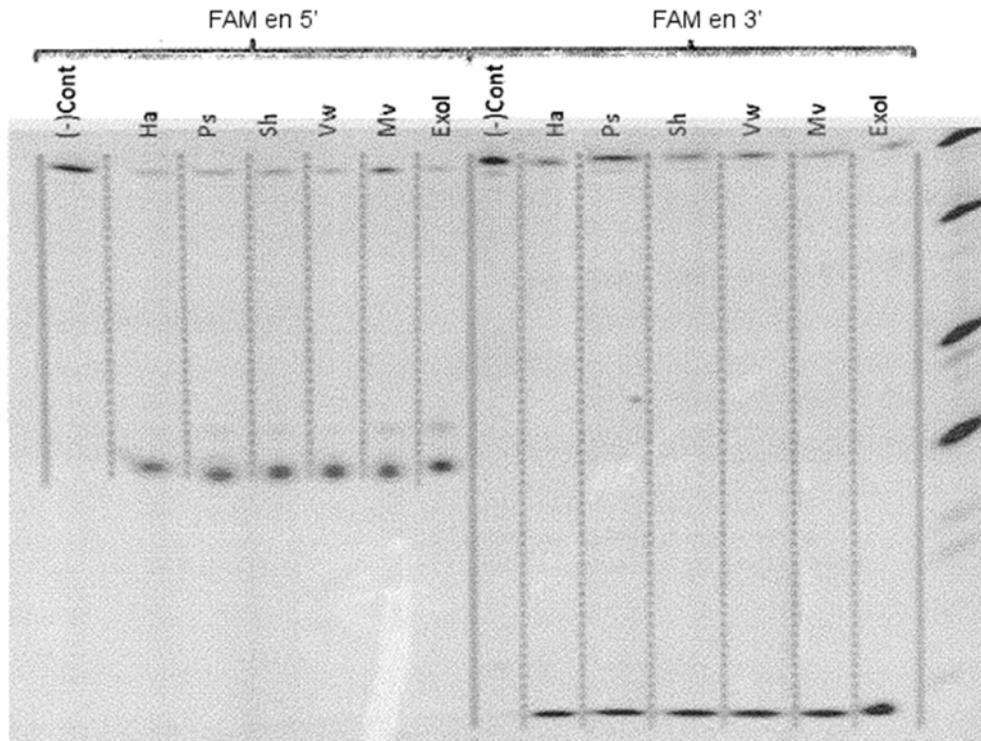


Figura 18

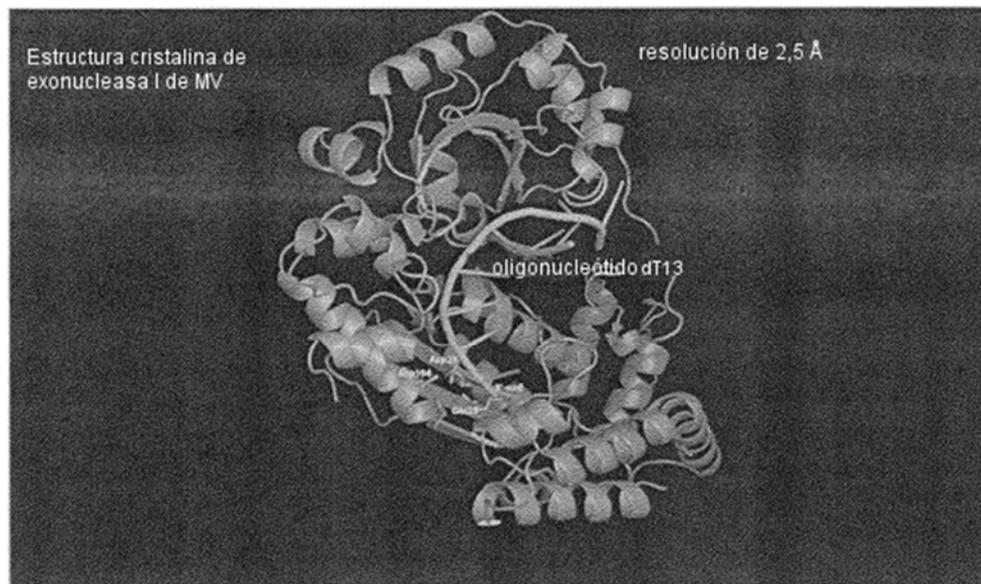


Figura 19

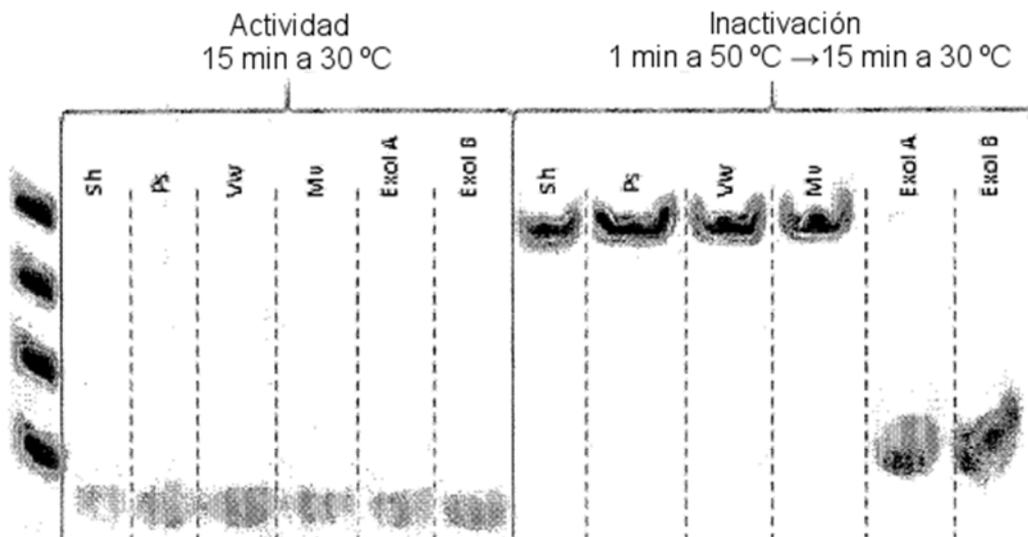


Figura 20

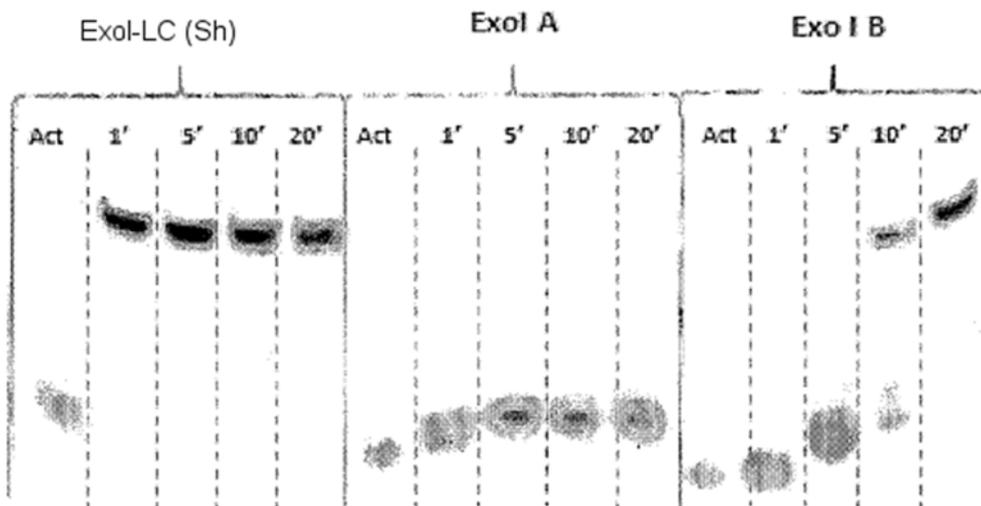
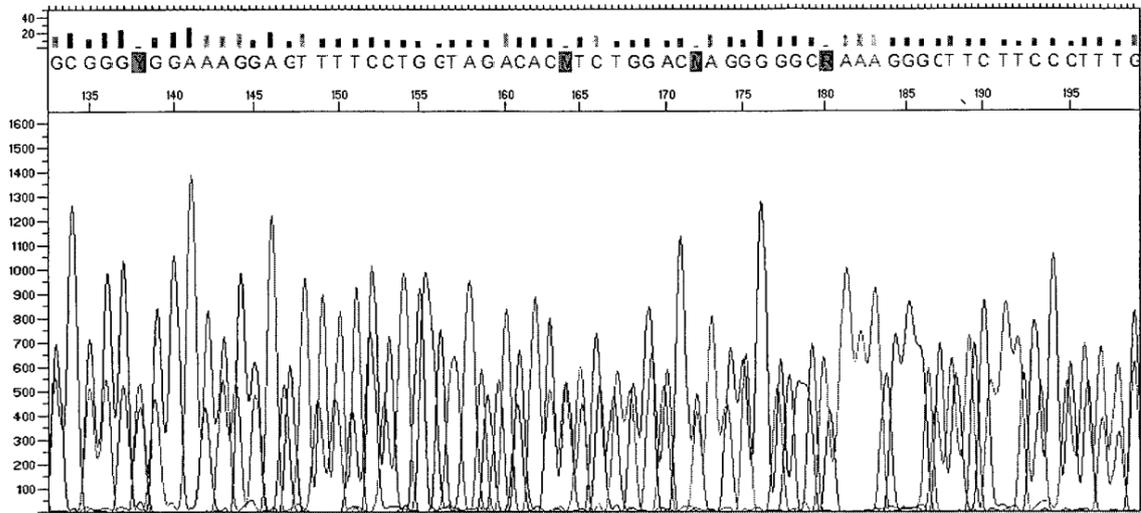
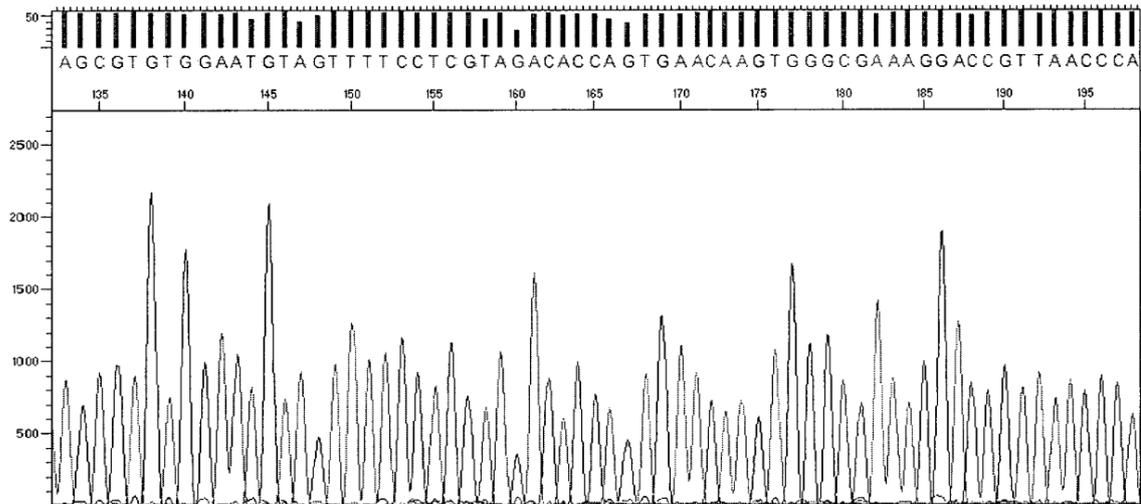


Figura 21a



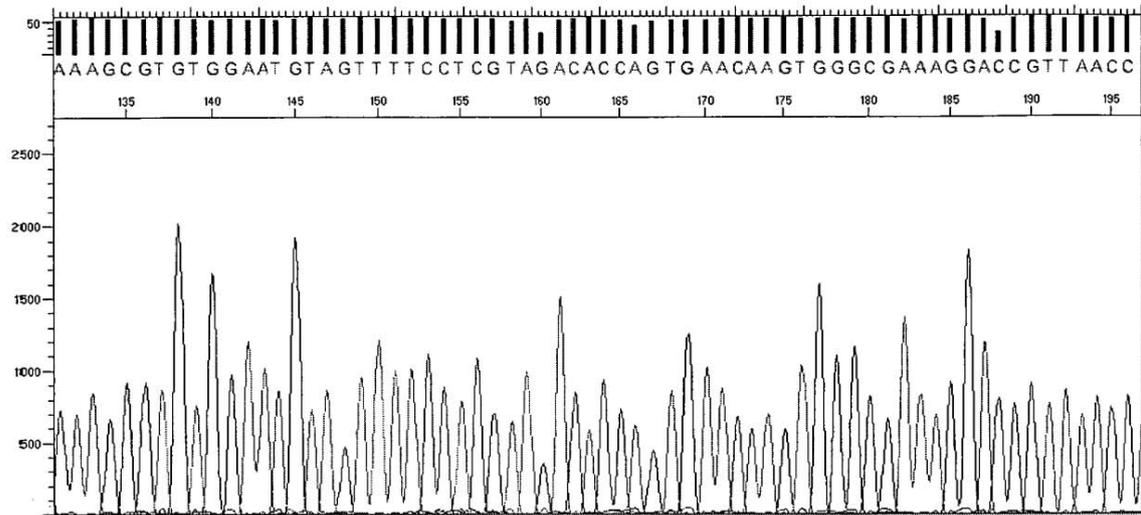
Control negativo

Figura 21b



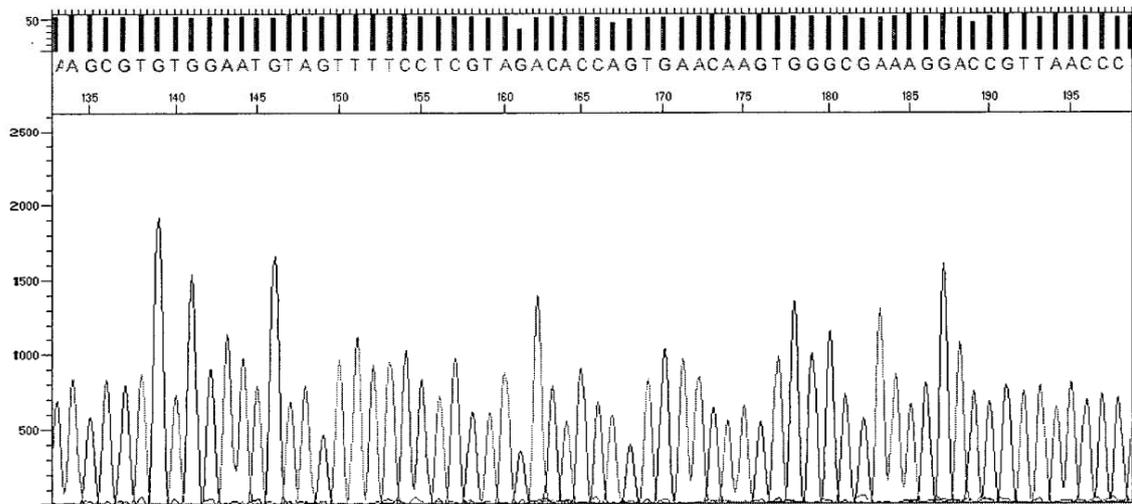
ExoSAP-IT

Figura 21c



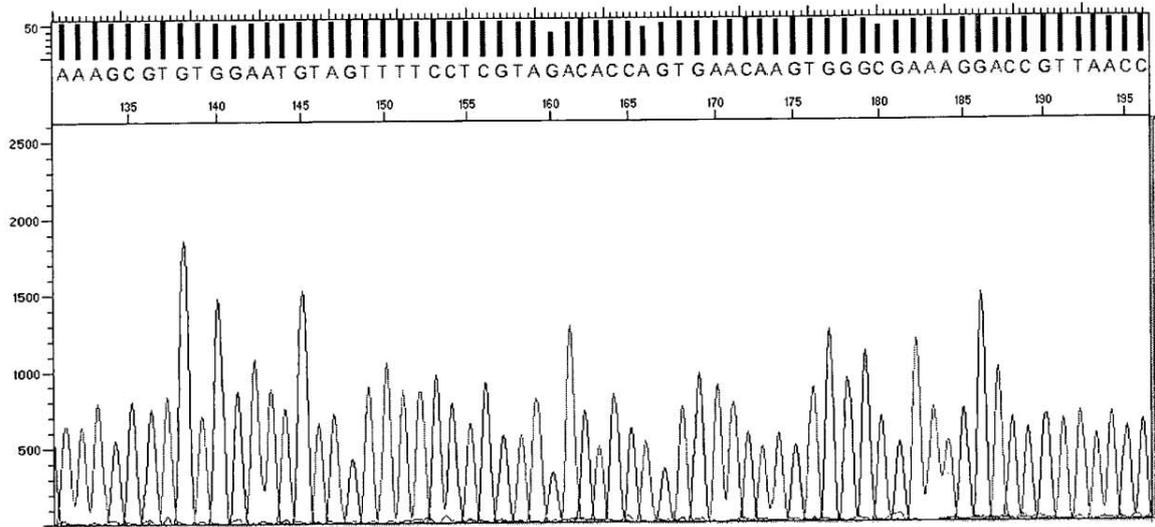
Exo1-LC (Sh)/SAP

Figura 21d



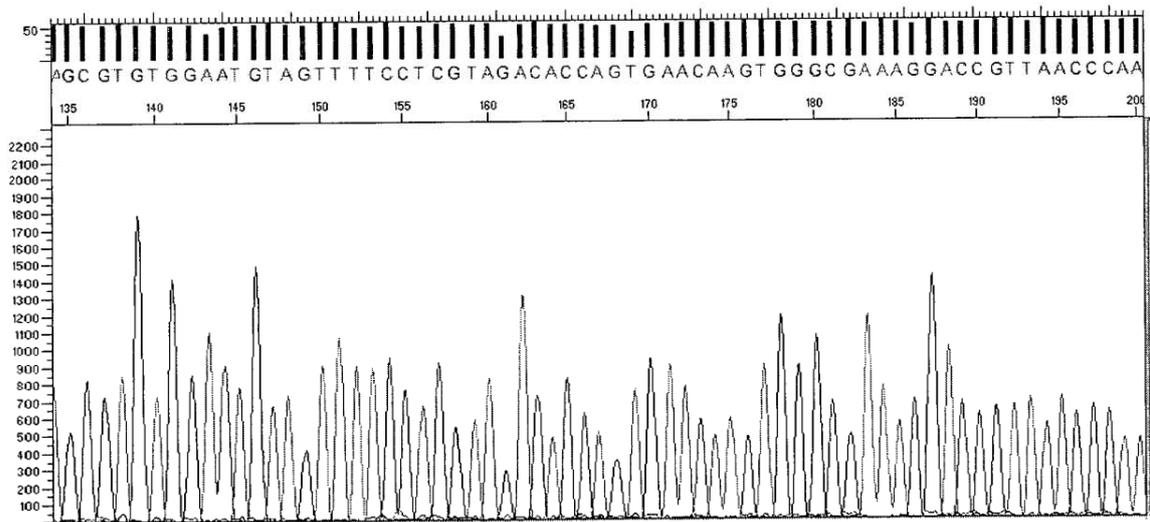
Exo1-LC (Ps)/SAP

Figura 21e



Exon-LC (Mw)/SAP

Figura 21f



Exon-LC (Vw)/SAP