

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 800**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2009 E 16169253 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3101124**

54 Título: **ADN polimerasas de tipo A modificadas**

30 Prioridad:

03.11.2008 US 110877 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

73 Titular/es:

**KAPA BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
200 Ballardvale Street, Suite 250
Wilmington, MA 01887, US**

72 Inventor/es:

**BOURN, WILLIAM;
APPEL, MARYKE;
RUSH, GAVIN;
FOSKETT, JOHN y
MCEWAN, PAUL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 742 800 T3

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

DESCRIPCIÓN

ADN polimerasas de tipo A modificadas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las ADN polimerasas son una familia de enzimas que usan ADN monocatenario como molde para sintetizar la hebra de ADN complementaria. En particular, las ADN polimerasas pueden añadir nucleótidos libres al extremo 3' de una hebra recién formada, dando como resultado el alargamiento de la nueva hebra en sentido 5'-3'. La mayoría de las ADN polimerasas son proteínas multifuncionales que poseen actividades tanto de polimerización como exonucleolíticas (por ejemplo, actividad exonucleasa 3' -> 5' o actividad exonucleasa 5' -> 3').

Las ADN polimerasas, al igual que otras enzimas naturales, han evolucionado durante millones de años para ser eficientes en su entorno celular natural. Muchas de ellas están casi perfectamente adaptadas para trabajar en ese entorno. En dicho entorno, la forma en que la proteína puede evolucionar se ve limitada por una serie de requisitos; la proteína tiene que interactuar con otros componentes celulares, tiene que funcionar en el citoplasma (es decir, a un pH particular, una fuerza iónica particular, en presencia de compuestos particulares, etc.) y no puede causar efectos secundarios letales o desventajosos que resten valor a la capacidad del organismo original como un todo.

Cuando las ADN polimerasas se eliminan de su entorno natural y se utilizan en aplicaciones industriales o de investigación, el entorno y las condiciones en las que opera la enzima son inevitablemente muy diferentes de aquellas en las que evolucionó. Muchas de las restricciones que limitaron la dirección evolutiva que la proteína podría tomar desaparecen. Por lo tanto, existen grandes posibilidades de mejora de las ADN polimerasas para su uso en aplicaciones industriales o de investigación.

El documento US2003/0134349 describe enzimas diseñadas para la detección directa, caracterización y cuantificación de ácidos nucleicos, en particular ARN que tiene una capacidad mejorada para escindir específicamente un miembro de ADN de un complejo que comprende hebras de ácido nucleico ADN y ARN. Las enzimas divulgadas en el documento US2003/0134349 incluyen determinados mutantes de Taq deficientes en polimerasa que, no obstante, retienen la actividad de escisión del ácido nucleico.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ADN polimerasas Taq modificadas como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Las polimerasas pueden ser más adecuadas para aplicaciones en tecnologías de ADN recombinante. En el presente documento se describen experimentos de evolución dirigida diseñados para seleccionar mutaciones que confieren fenotipos ventajosos en condiciones usadas en aplicaciones industriales o de investigación.

La presente invención también proporciona kits, secuencias de nucleótidos, vectores y células como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona además procedimientos como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

El dibujo es solo para propósitos de ilustración, no para limitación.

La figura 1 representa una alineación de secuencias de aminoácidos de las ADN polimerasas de tipo A naturales a partir de especies bacterianas termófilas. Las alteraciones de aminoácidos ejemplares descubiertas por los experimentos de evolución dirigida se muestran encima de cada alineación.

DEFINICIONES

Aminoácido: Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se puede incorporar en una cadena polipeptídica. En algunos modos de realización, un aminoácido tiene la estructura general $H_2N-C(H)(R)-COOH$. En algunos modos de realización, un aminoácido es un aminoácido natural. En algunos modos de realización, el aminoácido es un aminoácido sintético; en algunos modos de realización, un aminoácido es un D-aminoácido; en algunos modos de realización, un aminoácido es un L-aminoácido. "Aminoácido estándar" se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar encontrados comúnmente en péptidos naturales. "Aminoácido no estándar" se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara sintéticamente o se obtiene de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, "aminoácido sintético" engloba aminoácidos modificados químicamente, incluyendo pero sin limitarse a sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, incluyendo aminoácidos carboxi y/o aminoterminales en péptidos, se pueden modificar por metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos sin afectar negativamente a su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. El término "aminoácido" se usa de manera intercambiable con "residuo

aminoacídico" y se puede referir a un aminoácido libre y/o a un residuo aminoacídico de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o un residuo de un péptido. Cabe destacar que todas las secuencias de aminoácidos se representan en el presente documento por fórmulas con una orientación izquierda y derecha que está en el sentido convencional del extremo aminoterminal al carboxiterminal.

5 *Par de bases (pb):* Como se usa en el presente documento, par de bases se refiere a una asociación de adenina (A) con timina (T), o de citosina (C) con guanina (G) en una molécula de ADN bicatenario.

10 *Polimerasa quimérica:* Como se usa en el presente documento, el término "polimerasa quimérica" (también referido como "quimera") se refiere a cualquier polimerasa recombinante que contiene al menos una primera secuencia de aminoácidos derivada de una primera ADN polimerasa y una segunda secuencia de aminoácidos derivada de una segunda ADN polimerasa. Típicamente, la primera y segunda ADN polimerasas se caracterizan con al menos una característica funcional distinta (por ejemplo, procesividad, tasa de alargamiento, fidelidad). Como se usa en el presente documento, una secuencia derivada de una ADN polimerasa de interés se refiere a cualquier secuencia encontrada en la ADN polimerasa de interés, o cualquier secuencia que es al menos un 70 % (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) idéntica a una secuencia de aminoácidos encontrada en la ADN polimerasa de interés. Una "polimerasa quimérica" de acuerdo con la invención puede contener dos o más secuencias de aminoácidos de polimerasas relacionadas o similares (por ejemplo, proteínas que comparten secuencias y/o estructuras similares), unidas para formar una nueva proteína funcional. Una "polimerasa quimérica" de acuerdo con la invención puede contener dos o más secuencias de aminoácidos de polimerasas no relacionadas, unidas para formar una nueva proteína funcional. Por ejemplo, una polimerasa quimérica de la invención puede ser una fusión "entre especies" o "intergénica" de estructuras de proteína expresada por diferentes tipos de organismos.

25 *Complementario:* Como se usa en el presente documento, el término "complementario" se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos hebras polinucleotídicas o entre dos nucleótidos a través de emparejamiento de bases. Es conocido que un nucleótido adenina puede formar enlaces de hidrógeno específicos ("emparejamiento de bases") con un nucleótido que sea timina o uracilo. De forma similar, es conocido que un nucleótido citosina puede realizar emparejamiento de bases con un nucleótido guanina.

30 *Afinidad de unión a ADN:* Como se usa en el presente documento, el término "afinidad de unión a ADN" típicamente se refiere a la actividad de una ADN polimerasa en la unión al ácido nucleico ADN. En algunos modos de realización, la actividad de unión a ADN se puede medir en un ensayo de desplazamiento de dos bandas. Por ejemplo, en algunos modos de realización (basados en el ensayo de Guagliardi *et al.* (1997) J. Mol. Biol. 267:841-848), se marca ácido nucleico bicatenario (el fragmento HindIII-EcoRV de 452 pb del gen *lacS* de *S. solfataricus*) con ³²P a una actividad específica de al menos aproximadamente 2,5 x 10⁷ cpm/μg (o al menos aproximadamente 4000 cpm/fmol) usando procedimientos estándar. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) en 9.63-9.75 (que describe el marcaje terminal de ácidos nucleicos). Se prepara una mezcla de reacción que contiene al menos aproximadamente 0,5 μg del polipéptido en aproximadamente 10 μl de tampón de unión (tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0), glicerol al 10 %, KCl 25 mM, MgCl₂ 25 mM). Se calienta la mezcla de reacción a 37 °C durante 10 min. Aproximadamente 1 x 10⁴ a 5 x 10⁴ cpm (o aproximadamente 0,5-2 ng) del ácido nucleico bicatenario marcado se añade a la mezcla de reacción y se incuba durante 10 min adicionales. La mezcla de reacción se carga en un gel de poliacrilamida nativo en tampón tris-borato 0,5 X. Se somete la mezcla de reacción a electroforesis a temperatura ambiente. Se seca el gel y se somete a autorradiografía usando procedimientos estándar. Cualquier disminución detectable en la movilidad del ácido nucleico bicatenario marcado indica la formación de un complejo de unión entre el polipéptido y el ácido nucleico bicatenario. Dicha actividad de unión a ácido nucleico se puede cuantificar usando procedimientos densitométricos estándar para medir la cantidad de radioactividad en el complejo de unión con relación a la cantidad total de radioactividad en la mezcla de reacción inicial.

50 *Tasa de alargamiento:* Como se usa en el presente documento, el término "tasa de alargamiento" se refiere al promedio de la velocidad a la que una ADN polimerasa extiende una cadena polimérica. Como se usa en el presente documento, una alta tasa de alargamiento se refiere a una tasa de alargamiento mayor de 50 nt/s (por ejemplo, mayor de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140 nt/s). Como se usa en la presente solicitud, los términos "tasa de alargamiento" y "velocidad" se usan de manera intercambiable.

60 *Actividad enzimática:* Como se usa en el presente documento, el término "actividad enzimática" se refiere a la especificidad y eficacia de una ADN polimerasa. La actividad enzimática de una ADN polimerasa también se denomina "actividad polimerasa", lo que se refiere típicamente a la actividad de una ADN polimerasa al catalizar la síntesis dirigida a molde de un polinucleótido. La actividad enzimática de una polimerasa se puede medir usando diversas técnicas y procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las diluciones en serie de la polimerasa se pueden preparar en tampón de dilución (por ejemplo, Tris. Cl 20 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, NP 40 al 0,5 % y Tween-20 al 0,5 %). Para cada dilución, se pueden retirar 5 μl y añadirse a 45 μl de una mezcla de reacción que contiene TAPS 25 mM (pH 9,25), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dATP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dTTP 0,2 mM, dCTP 0,1 mM, 12,5 μg de ADN activado, [α-³²P]dCTP 100 μM (0,05 μCi/nmol) y agua desionizada estéril. Las mezclas de reacción se pueden incubar a 37 °C (o 74 °C para ADN polimerasas termoestables) durante 10 minutos y a continuación detener por enfriamiento

inmediato de la reacción a 4 °C y adición de 10 µl de EDTA 60 mM helado. Se puede retirar una alícuota de 25 µl de cada mezcla de reacción. Se puede retirar dCTP marcado radioactivamente no incorporado de cada alícuota por filtración en gel (Centri-Sep, Princeton Separations, Adelphia, N.J.). El eluido de columna se puede mezclar con líquido de centelleo (1 ml). Se cuantifica la radioactividad en el eluido de columna con un contador de centelleo para determinar la cantidad de producto sintetizado por la polimerasa. Una unidad de actividad polimerasa se puede definir como la cantidad de polimerasa necesaria para sintetizar 10 nmol de producto en 30 minutos (Lawyer *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:6427-647). Otros procedimientos de medición de la actividad polimerasa son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)).

Fidelidad: Como se usa en el presente documento, el término "fidelidad" se refiere a la exactitud de la polimerización de ADN por la ADN polimerasa dependiente de molde. La fidelidad de una ADN polimerasa se mide típicamente por la tasa de error (la frecuencia de incorporar un nucleótido inexacto, es decir, un nucleótido que no se incorpora de una manera dependiente del molde). La exactitud o fidelidad de la polimerización de ADN se mantiene tanto para la actividad polimerasa como para la actividad exonucleasa de una ADN polimerasa. El término "alta fidelidad" se refiere a una tasa de error menor de $4,45 \times 10^{-6}$ (por ejemplo, menor de $4,0 \times 10^{-6}$, $3,5 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$, $2,5 \times 10^{-6}$, $2,0 \times 10^{-6}$, $1,5 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $0,5 \times 10^{-6}$) mutaciones/nt/duplicación. La fidelidad o tasa de error de una ADN polimerasa se puede medir usando ensayos conocidos para la técnica. Por ejemplo, las tasas de error de las ADN polimerasas se pueden someter a prueba usando el ensayo de fidelidad de PCR con *lacI* descrito en Cline, J. *et al.* (96) NAR 24: 3546-3551. En resumen, se amplifica un fragmento de 1,9 kb que codifica el gen diana *lacIOlacZα* a partir de ADN plasmídico de pPRIAZ usando 2,5 U de ADN polimerasa (es decir, cantidad de enzima necesaria para incorporar 25 nmoles de dNTP totales en 30 min a 72 °C) en el tampón de PCR apropiado. A continuación se clonan los productos de PCR que contienen *lacI* en brazos GT10 lambda, y se determina el porcentaje de mutantes de *lacI* (MF, frecuencia de mutación) en un ensayo de cribado por color, como se describe (Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. y Mathur, E. J. (1991) *Gene* 180: 1-8). Las tasas de error se expresan como frecuencia de mutación por pb por duplicación (MF/pb/d), donde pb es el número de sitios detectables en la secuencia génica *lacI* (349) y d es el número de duplicaciones de diana eficaces. Similar a lo anterior, se puede usar cualquier plásmido que contiene el gen diana *lacIOlacZα* como molde para la PCR. El producto de PCR se puede clonar en un vector diferente de lambda GT (por ejemplo, plásmido) que permita el cribado por color azul/blanco.

ADN polimerasa de fusión: Como se usa en el presente documento, el término "ADN polimerasa de fusión" se refiere a cualquier ADN polimerasa que se combina (por ejemplo, de forma covalente o no covalente) con uno o más dominios de proteína que tienen una actividad deseada (por ejemplo, unión a ADN, estabilización de complejos molde-cebador, hidrólisis de dUTP). En algunos modos de realización, el uno o más dominios de proteína se derivan de una proteína no polimerasa. Típicamente, las ADN polimerasas de fusión se generan para mejorar determinadas características funcionales (por ejemplo, procesividad, tasa de alargamiento, fidelidad, resistencia a sales, etc.) de una ADN polimerasa.

ADN polimerasa modificada: Como se usa en el presente documento, el término "ADN polimerasa modificada" se refiere a una ADN polimerasa originada a partir de otra ADN polimerasa (es decir, original) y contiene una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustitución, delección o inserción de aminoácidos) en comparación con la ADN polimerasa original. En algunos modos de realización, una ADN polimerasa modificada de la invención se origina o modifica a partir de una ADN polimerasa natural. En algunos modos de realización, una ADN polimerasa modificada de la invención se origina o modifica a partir de una ADN polimerasa recombinante o genomaniplada que incluye, pero sin limitarse a, ADN polimerasa quimérica, ADN polimerasa de fusión u otra ADN polimerasa modificada. Típicamente, una ADN polimerasa modificada tiene al menos un fenotipo cambiado en comparación con la polimerasa original.

Mutación: Como se usa en el presente documento, el término "mutación" se refiere a un cambio introducido en una secuencia original que incluye, pero sin limitarse a, sustituciones, inserciones, delecciones (incluyendo truncamientos). Las consecuencias de una mutación incluyen, pero no se limitan a, la creación de un nuevo carácter, propiedad, función, fenotipo o rasgo que no se encuentra en la proteína codificada por la secuencia original. En el presente documento, el término "mutación" se usa de manera intercambiable con "alteración".

Mutante: Como se usa en el presente documento, el término "mutante" se refiere a una proteína modificada que muestra características alteradas cuando se compara con la proteína original.

Unido: Como se usa en el presente documento, "unido" se refiere a cualquier procedimiento conocido en la técnica para conectar funcionalmente dominios de polipéptidos, incluyendo sin limitación fusión recombinante con o sin dominios intermedios, fusión intermedia, asociación no covalente y enlace covalente, incluyendo enlace disulfuro, enlace de hidrógeno, enlace electrostático y enlace conformacional.

Nucleótido: Como se usa en el presente documento, una unidad monomérica de ADN o ARN que consiste en un resto glucídico (pentosa), un fosfato y una base heterocíclica nitrogenada. La base se une al resto glucídico por el carbono glucosídico (carbono 1' de la pentosa) y esa combinación de base y glúcido es un nucleósido. Cuando el nucleósido contiene un grupo fosfato unido a la posición 3' o 5' de la pentosa se denomina nucleótido. Una secuencia de

nucleótidos unidos de forma funcional se denomina típicamente en el presente documento "secuencia de bases" o "secuencia de nucleótidos", y se representa en el presente documento por una fórmula con una orientación de izquierda a derecha que está en el sentido convencional del extremo 5' al extremo 3'.

5 *Tintes de intercalación de ácidos nucleicos:* Como se usa en el presente documento, el término "tintes de intercalación de ácidos nucleicos" se refiere a cualquier molécula que se une a los ácidos nucleicos de manera reversible, no covalente, por inserción entre los pares de bases de la doble hélice, indicando de este modo la presencia y cantidad de ácidos nucleicos. En general, los tintes de intercalación de ácidos nucleicos son moléculas cromóforas planas, aromáticas y con forma de anillo. En algunos modos de realización, los tintes de intercalación incluyen tintes
10 fluorescentes. En la técnica se conocen numerosos tintes de intercalación. Algunos ejemplos no limitantes incluyen PICO GREEN (P-7581, Molecular Probes), EB (E-8751, Sigma), yoduro de propidio (P-4170, Sigma), naranja de acridina (A-6014, Sigma), 7-aminoactinomicina D (A-1310, Molecular Probes), tintes de cianina (por ejemplo, TOTO, YOYO, BOBO y POPO), SYTO, Verde SYBR I, Verde SYBR II, SYBR DX, OliGreen, CyQuant GR, Verde SYTOX, SYTO9, SYTO10, SYTO17, SYBR14, FUN-1, Rojo DEAD, yoduro de hexidio, dihidroetidio, homodímero de etidio, 9-
15 amino-6-cloro-2-metoxiacridina, DAPI, DIPI, tinte de indol, tinte de imidazol, actinomicina D, hidroxistilbamidina y LDS 751 (patente de EE. UU. n.º 6.210.885), BOXTO, Verde LC, Evagreen, Bebo.

Oligonucleótido o polinucleótido: Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se define como una molécula que incluye dos o más desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la función definitiva o el uso del oligonucleótido. El oligonucleótido se puede derivar sintéticamente o por clonación. Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de polímero compuesta de monómeros nucleotídicos unidos de forma covalente en una cadena. ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) son ejemplos de polinucleótidos.

25 *Polimerasa:* Como se usa en el presente documento, una "polimerasa" se refiere a una enzima que cataliza la polimerización de nucleótido (es decir, la actividad polimerasa). En general, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador hibridado a una secuencia molde de polinucleótido, y avanzará hacia el extremo 5' de la hebra molde. Una "ADN polimerasa" cataliza la polimerización de desoxinucleótidos.

30 *Cebador:* Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea natural o producido sintéticamente, que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico cuando se dispone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico, por ejemplo, en presencia de cuatro nucleótidos trifosfatos diferentes y enzima termoestable en un tampón apropiado ("tampón" incluye pH, fuerza iónica, cofactores, etc., apropiados) y a una temperatura adecuada. El cebador es preferentemente monocatenario para eficacia máxima en la amplificación, pero puede ser de forma alternativa bicatenario. Si es bicatenario, en primer lugar se trata el cebador para separar sus hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia de la enzima termoestable. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente de cebador y uso del procedimiento. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene típicamente 15-25 nucleótidos, aunque puede contener más o menos nucleótidos. En general, las moléculas cebadoras cortas requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde.

45 *Procesividad:* Como se usa en el presente documento, "procesividad" se refiere a la capacidad de una polimerasa para mantenerse unida al molde y realizar múltiples reacciones de modificación. Las "reacciones de modificación" incluyen pero no se limitan a polimerización y escisión exonucleolítica. En algunos modos de realización, "procesividad" se refiere a la capacidad de una ADN polimerasa de realizar una secuencia de etapas de polimerización sin disociación intermedia de la enzima de las cadenas de ADN crecientes. Típicamente, la "procesividad" de una ADN polimerasa se mide por la longitud de nucleótidos (por ejemplo 20 nt, 300 nt, 0,5-1 kb, o más) que polimerizan o se modifican sin disociación intermedia de la ADN polimerasa de la cadena de ADN creciente. La "procesividad" puede depender de la naturaleza de la polimerasa, la secuencia de un molde de ADN, y condiciones de reacción, por ejemplo, concentración de sal, temperatura o presencia de proteínas específicas. Como se usa en el presente documento, el término "alta procesividad" se refiere a una procesividad mayor de 20 nt (por ejemplo, mayor de 40 nt, 60 nt, 80 nt, 100 nt, 120 nt, 140 nt, 160 nt, 180 nt, 200 nt, 220 nt, 240 nt, 260 nt, 280 nt, 300 nt, 320 nt, 340 nt, 360 nt, 380 nt, 400 nt, o mayor) por asociación/disociación con el molde. La procesividad se puede medir de acuerdo con los procedimientos definidos en el presente documento y en el documento WO 01/92501 A1.

60 *Síntesis:* Como se usa en el presente documento, el término "síntesis" se refiere a cualquier procedimiento *in vitro* para preparar una nueva hebra de polinucleótido o alargar un polinucleótido existente (es decir, ADN o ARN) de manera dependiente del molde. La síntesis, de acuerdo con la invención, incluye amplificación, lo que incrementa el número de copias de una secuencia molde de polinucleótido con el uso de una polimerasa. La síntesis de polinucleótidos (por ejemplo, amplificación) da como resultado la incorporación de nucleótidos en un polinucleótido (es decir, un cebador) formando de este modo una nueva molécula de polinucleótido complementaria al molde de polinucleótido. La molécula de polinucleótido formada y su molde se pueden usar como moldes para sintetizar

moléculas de polinucleótidos adicionales. "Síntesis de ADN", como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, PCR, el marcaje de polinucleótido (es decir, para sondas y cebadores oligonucleotídicos), secuenciación de polinucleótidos.

5 *Molécula de ADN molde*: Como se usa en el presente documento, el término "molécula de ADN molde" se refiere a una hebra de un ácido nucleico a partir de la cual se sintetiza una hebra de ácido nucleico complementaria por una ADN polimerasa, por ejemplo, en una reacción de extensión de cebador.

10 *Manera dependiente de molde*: Como se usa en el presente documento, el término "manera dependiente de molde" se refiere a un procedimiento que implica la extensión dependiente de molde de una molécula cebadora (por ejemplo, síntesis de ADN por ADN polimerasa). El término "manera dependiente de molde" se refiere típicamente a síntesis de polinucleótidos de ARN o ADN en la que la secuencia de la hebra de polinucleótido recién sintetizada se dicta por las normas bien conocidas del emparejamiento de bases complementarias (véase, por ejemplo, Watson, J. D. *et al.*, en: Molecular Biology of the Gene, 4.^a ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. (1987)).

15 *Enzima termoestable*: Como se usa en el presente documento, el término "enzima termoestable" se refiere a una enzima que es estable al calor (también denominada termorresistente) y cataliza (facilita) la polimerización de nucleótidos para formar productos de extensión de cebadores que son complementarios de una secuencia molde de polinucleótido. Típicamente, las polimerasas estables termoestables son preferentes en un procedimiento de termociclado en el que se desnaturalizan ácidos nucleicos bicatenarios por exposición a una alta temperatura (por ejemplo, aproximadamente 95 °C) durante el ciclo de PCR. Una enzima termoestable descrita en el presente documento eficaz para una reacción de amplificación de PCR satisface al menos un criterio, es decir, la enzima no se desnaturaliza (se inactiva) de forma irreversible cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácidos nucleicos bicatenarios. La desnaturalización irreversible para los propósitos del presente documento se refiere a la pérdida permanente y completa de actividad enzimática. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal del tampón y la longitud y composición nucleotídica de los ácidos nucleicos que se están desnaturalizando, pero típicamente varían desde aproximadamente 90 °C hasta aproximadamente 96 °C durante un tiempo que depende principalmente de la temperatura y la longitud del ácido nucleico, típicamente desde aproximadamente 0,5 hasta diez minutos. Se pueden tolerar temperaturas más altas a medida que se incrementa la concentración de sal del tampón y/o la composición GC del ácido nucleico. En algunos modos de realización, las enzimas termoestables no se desnaturalizarán de forma irreversible a aproximadamente 90 °C-100 °C. Típicamente, una enzima termoestable adecuada para la invención tiene una temperatura óptima a la que funciona que es mayor de aproximadamente 40 °C, que es la temperatura por debajo de la cual se promueve la hibridación del cebador al molde, aunque, dependiendo de (1) las concentraciones de sal y magnesio y (2) la composición y longitud del cebador, la hibridación se puede producir a temperatura más alta (por ejemplo, 45 °C-70 °C). Cuanto mayor sea la temperatura óptima para la enzima, mayor será la especificidad y/o selectividad del procedimiento de extensión dirigida por cebador. Sin embargo, las enzimas que son activas por debajo de 40 °C (por ejemplo, a 37 °C) también están en el alcance de la presente invención siempre que sean termoestables. En algunos modos de realización, la temperatura óptima varía desde aproximadamente 50 °C hasta 90 °C (por ejemplo, 60 °C-80 °C).

Natural: Como se usa en el presente documento, el término "natural" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente natural.

45 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En el presente documento se describen, entre otras cosas, las ADN polimerasas modificadas (por ejemplo, ADN polimerasas de tipo A) que contienen alteraciones de aminoácidos basadas en mutaciones identificadas en experimentos de evolución dirigida diseñados para seleccionar enzimas que sean más adecuadas para aplicaciones en tecnologías de ADN recombinante.

50 Como se describe en la sección de ejemplos, los autores de la presente invención han desarrollado con éxito experimentos de evolución dirigida de ADN polimerasas imitando los entornos y condiciones típicos o menos típicos en los que se usa normalmente o se espera que se vaya a usar una enzima en aplicaciones industriales o de investigación reales

55 Como se discute en los ejemplos, se han observado diversas mutaciones durante el procedimiento de selección (véase la Tabla 2). Muchas mutaciones confieren ventajas relacionadas con las características de las enzimas, que incluyen, pero sin limitarse a, eficacia de expresión, solubilidad y robustez en el plegado, termoestabilidad, actividad de polimerización, procesividad, velocidad (tasa de alargamiento), solidez de la concentración, resistencia a las impurezas, resistencia a los aditivos químicos, fidelidad, evitación de los dímeros de cebadores, actividad de desplazamiento de hebra, actividad nucleasa alterada, selectividad de nucleótidos y otras propiedades y características implicadas en el procedimiento de polimerización de ADN.

65 Se contempla que las mutaciones identificadas en el presente documento confieren una variedad de fenotipos que pueden hacer que las ADN polimerasas sean más adecuadas para aplicaciones en tecnologías de ADN recombinante.

Por ejemplo, las mutaciones identificadas de acuerdo con la presente invención pueden conferir fenotipos enzimáticos relacionados con las ventajas selectivas descritas en este documento. De hecho, los autores de la presente invención han identificado o esperan identificar polimerasas mutantes que se expresan bien, son más solubles, muestran más alta actividad, fidelidad, procesividad y/o velocidad, que están activas en un amplio intervalo de concentraciones, que son resistentes a sales, aditivos de PCR (por ejemplo, potenciadores de PCR) y/o inhibidores, que funcionan en un intervalo de concentraciones y tienen una fidelidad más alta, y otros fenotipos que pueden no ser medibles de inmediato. Dado que muchos de estos fenotipos pueden depender de la manera en que interactúan el ADN y la polimerasa, se contempla que muchas de las mutaciones identificadas de acuerdo con la presente invención pueden afectar a las características de unión de la ADN polimerasa.

Además, se contempla que las mutaciones identificadas en el presente documento puedan conferir fenotipos enzimáticos que no estén directamente relacionados con las ventajas selectivas descritas en el presente documento. Por ejemplo, algunos fenotipos pueden no conferir ninguna ventaja, sino simplemente ser un efecto secundario de la mutación ventajosa. Además, algunos mutantes pueden mostrar fenotipos que se podrían considerar desventajosos. Por ejemplo, algunas mutaciones confieren una ventaja (por ejemplo, alta actividad), pero esta ventaja tiene un costo (por ejemplo, alta tasa de errores). Si la ventaja supera a la desventaja, la mutación todavía se seleccionará. Dichas mutaciones pueden tener usos comerciales. Por ejemplo, una enzima de baja fidelidad se podría usar en una PCR propensa a error (por ejemplo, para mutagénesis).

Las mutaciones y los clones mutantes ejemplares que contienen combinaciones de mutaciones asociadas con fenotipos específicos se analizan en la sección de ejemplos y se muestran al menos en las Tablas 3, 4, 5, 8, 12 y 15.

Se contempla además que, dado que muchas ADN polimerasas tienen secuencias, estructuras y dominios funcionales similares, las mutaciones y/o las posiciones donde se producen las mutaciones identificadas en el presente documento pueden servir como bases para la modificación de las ADN polimerasas en general. Por ejemplo, mutaciones iguales o similares, así como otras alteraciones, se pueden introducir en las posiciones correspondientes en diversas ADN polimerasas para generar enzimas modificadas que se adapten mejor para uso recombinante.

ADN polimerasas

ADN polimerasas naturales

Las ADN polimerasas naturales incluyen ADN polimerasas de tipo A (también conocidas como ADN polimerasas de familia A). Las ADN polimerasas de tipo A se clasifican en base a la homología de secuencia de aminoácidos con la polimerasa I de *E. coli* (Braithwaite e Ito, *Nuc. Acids. Res.* 21:787-802, 1993), e incluyen polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), ADN polimerasa I de *Thermus flavus*, ADN polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*, polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus*, polimerasa del fago T5, polimerasa del fago T7, ADN polimerasa mitocondrial gamma, así como polimerasas adicionales que se analizan a continuación.

Las ADN polimerasas de la familia A están disponibles comercialmente, incluyendo la polimerasa Taq (New England BioLabs), polimerasa I de *E. coli* (New England BioLabs), el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli* (New England BioLabs) y la ADN polimerasa T7 (New England BioLabs) y la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst) (New England BioLabs).

Las ADN polimerasas también se pueden derivar de bacterias u otros organismos con temperaturas de crecimiento óptimas que son similares a las temperaturas de ensayo deseadas. Por ejemplo, dichas bacterias u otros organismos adecuados pueden presentar temperaturas de crecimiento máximas de >80 °C-85 °C o temperaturas de crecimiento óptimas de >70 °C-80 °C.

La información de secuencia de muchas ADN polimerasas de tipo A está disponible públicamente. La Tabla 1 proporciona una lista de los números de acceso de GenBank y otra información de acceso de GenBank para las ADN polimerasas de tipo A ejemplares, incluyendo las especies de las que se derivan.

Tabla 1. Información de acceso de secuencia para determinadas ADN polimerasas de tipo A

Geobacillus stearothermophilus

ACCESO: 3BDP_A

VERSIÓN: 3BDP_A GI: 4389065

DBSOURCE pdb: molécula 3BDP, cadena 65, publicación del 27 de agosto de 2007.

Natranaerobius thermophilus JW/NM-WN-LF

ACCESO: ACB85463

VERSIÓN: ACB85463.1 GI: 179351193

DBSOURCE acceso CP001034.1

Thermus thermophilus HB8

ACCESO: P52028

VERSIÓN: P52028.2 GI: 62298349

DBSOURCE swissprot: locus DPO1T_THET8, acceso P52028

5

Thermus thermophilus

ACCESO: P30313

VERSIÓN: P30313.1 GI: 232010

DBSOURCE swissprot: locus DPO1F_THETH, acceso P30313

Thermus caldophilus

ACCESO: P80194

VERSIÓN: P80194.2 GI: 2506365

DBSOURCE swissprot: locus DPO1_THECA, acceso P80194

Thermus filiformis

ACCESO: O52225

VERSIÓN: O52225.1 GI: 3913510

DBSOURCE swissprot: locus DPO1_THEFI, acceso O52225

Thermus filiformis

ACCESO: AAR11876

VERSIÓN: AAR11876.1 GI: 38146983

DBSOURCE acceso AY247645.1

Thermus aquaticus

ACCESO: P19821

VERSIÓN: P19821.1 GI: 118828

DBSOURCE swissprot: locus DPO1_THEAQ, acceso P19821

Thermotoga lettingae TMO

ACCESO: YP_001469790

VERSIÓN: YP_001469790.1 GI: 157363023

DBSOURCE REFSEQ: acceso NC_009828.1

Thermosipho melanesiensis BI429

ACCESO: YP_001307134

VERSIÓN: YP_001307134.1 GI: 150021780

DBSOURCE REFSEQ: acceso NC_009616.1

Thermotoga petrophila RKU-1

ACCESO: YP_001244762
 VERSIÓN: YP_001244762.1 GI: 148270302
 DBSOURCE REFSEQ: acceso NC_009486.1

Thermotoga maritima MSB8

ACCESO: NP_229419
 VERSIÓN: NP_229419.1 GI: 15644367
 DBSOURCE REFSEQ: acceso NC_000853.1

Thermodesulfovibrio yellowstonii DSM 11347

ACCESO: YP_002249284
 VERSIÓN: YP_002249284.1 GI: 206889818
 DBSOURCE REFSEQ: acceso NC_011296.1

Dictyoglomus thermophilum

ACCESO: AAR11877
 VERSIÓN: AAR11877.1 GI: 38146985
 DBSOURCE acceso AY247646.1

Geobacillus sp. MKK-2005

ACCESO: ABB72056
 VERSIÓN: ABB72056.1 GI: 82395938
 DBSOURCE acceso DQ244056.1

5

Bacillus caldotenax

ACCESO: BAA02361
 VERSIÓN: BAA02361.1 GI: 912445
 DBSOURCE locus BACPOLYTG acceso D12982.1

Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus

ACCESO: AAC85580
 VERSIÓN: AAC85580.1 GI: 3992153
 DBSOURCE locus AR003995 acceso AAC85580.1

Thermoanaerobacter pseudethanolicus ATCC 33223

ACCESO: ABY95124
 VERSIÓN: ABY95124.1 GI: 166856716
 DBSOURCE acceso CP000924.1

Fago de enterobacterias T5

ACCESO: AAS77168 CAA04580
 VERSIÓN: AAS77168.1 GI: 45775036
 DBSOURCE acceso AY543070.1

Fago de enterobacterias T7 (T7)

ACCESO: NP_041982
 VERSIÓN: NP_041982.1 GI: 9627454
 DBSOURCE REFSEQ: acceso NC_001604.1

10

ADN polimerasas truncadas

Las ADN polimerasas incluyen versiones truncadas de polimerasas naturales (por ejemplo, un fragmento de una ADN polimerasa resultante de una delección N terminal, C terminal o interna que retiene la actividad polimerasa). Una ADN polimerasa truncada ejemplar es KlenTaq, que contiene una delección de una parte del dominio exonucleasa 5' a 3' (véase, Barnes W. M. (1992) *Gene* 112:29-35; y Lawyer F.C. *et al.* (1993) *PCR Methods and Applications*, 2:275-287).

ADN polimerasas quiméricas

Las ADN polimerasas quiméricas incluyen cualquier ADN polimerasa que contenga secuencias derivadas de dos o más ADN polimerasas diferentes, como se describe en la solicitud pendiente titulada "ADN polimerasas quiméricas" presentada en la misma fecha.

Las ADN polimerasas quiméricas también se describen en la publicación de EE. UU. n.º 20020119461, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.228.628 y 7.244.602.

ADN polimerasas de fusión

Las ADN polimerasas de fusión incluyen cualquier ADN polimerasa que se combine (por ejemplo, de forma covalente o no covalente) con uno o más dominios de proteína que tengan una actividad deseada (por ejemplo, unión a ADN, hidrólisis de dUTP o estabilización de complejos molde-cebador). En algunos modos de realización, el uno o más dominios de proteína que tienen la actividad deseada se derivan de una proteína no polimerasa. Típicamente, las ADN polimerasas de fusión se generan para mejorar determinadas características funcionales (por ejemplo, procesividad, tasa de alargamiento, fidelidad, resistencia a sales, tolerancia de dUTP, etc.) de una ADN polimerasa. Por ejemplo, la ADN polimerasa se ha fusionado en el marco de los motivos de unión hélice-horquilla-hélice de ADN topoisomerasa V y se ha demostrado que incrementa la procesividad, resistencia a sales y termoestabilidad de la ADN polimerasa de fusión como se describe en Pavlov *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:13510-13515. La fusión del dominio de unión a tiorredoxina a la ADN polimerasa T7 potencia la procesividad de la fusión de ADN polimerasa en presencia de tiorredoxina como se describe en el documento WO 97/29209, la patente de EE. UU. n.º 5.972.603 y Bedford *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:479-484 (1997). La fusión del dominio de unión PCNA arqueal a ADN polimerasa Taq da como resultado una fusión de ADN polimerasa que tiene una procesividad potenciada y produce mayores rendimientos de ADN amplificado por PCR en presencia de PCNA (Motz, M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 3 de mayo de 2002; 277 (18); 16179-88). Además, se demostró que la fusión de la proteína de unión a ADN de secuencia inespecífica *Sso7d* o *Sac7d* de *Sulfolobus sulfataricus* a una ADN polimerasa, tal como ADN polimerasa Pfu o Taq, incrementa considerablemente la procesividad de estas ADN polimerasas como se divulga en el documento WO 01/92501 A1. Polimerasas de fusión adicionales se describen en la publicación de EE. UU. n.º 20070190538A1.

Las polimerasas de fusión ejemplares disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, TopoTaq™ (Fidelity Systems) que es un híbrido de polimerasa Taq fusionado a un motivo hélice-horquilla-hélice (HhH) de secuencia inespecífica de ADN topoisomerasa V (Topo V) (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.427.928; 5.656.463; 5.902.879; 6.548.251; Pavlov *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:13510-13515); Phusion™ (Finnzymes and NEB, vendida por BioRad como iProof) que es una ADN polimerasa Deep Vent™/Pfu quimérica fusionada a una pequeña proteína *Sso7d* similar a la cromatina básica (véase la patente de EE. UU. n.º 6627424, las publicaciones de solicitud de EE. UU. n.ºs 20040191825, 20040081963, 20040002076, 20030162173, 20030148330, y Wang *et al.*, 2004, *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1197-1207); PfuUltra™ II Fusion (Stratagene) que es una ADN polimerasa basada en Pfu fusionada a una proteína de unión a ADN de doble cadena (solicitud de EE. UU. n.º 20070148671); Herculanase II Fusión (Stratagene) que es una enzima herculana II fusionada a un dominio de unión a ADN; y Pfx50 (Invitrogen) que es una ADN polimerasa de *T. zilligii* fusionada a una proteína accesoria que estabiliza los complejos cebador-molde.

Generación de ADN polimerasas modificadas

Las ADN polimerasas modificadas se pueden generar introduciendo una o más alteraciones de aminoácidos en una ADN polimerasa en las posiciones correspondientes a las posiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, las posiciones identificadas en las Tablas 2, 3, 4, 5, 8, 12 y 15).

Las correspondientes posiciones en diversas ADN polimerasas se pueden determinar por alineación de secuencias de aminoácidos. Se puede lograr la alineación de secuencias de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa informático BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Preferentemente, se usa el programa informático WU-BLAST-2 para determinar la identidad de secuencia de aminoácidos (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266, 460-480 (1996); URL: //blast.wustl/edu/blast/README.html). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, de los que la mayoría se establecen como los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: intervalo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, valor umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros de puntuación HSP (S) y HSP S2 son valores dinámicos y se establecen por el

propio programa, dependiendo de la composición de la secuencia particular; sin embargo, los valores mínimos se pueden ajustar y se fijan como se indica anteriormente. Un ejemplo de una alineación se muestra en la figura 1.

Las alteraciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más residuos de aminoácidos. La alteración apropiada para cada posición se puede determinar examinando la naturaleza y la gama de mutaciones en la posición correspondiente descrita en el presente documento. Las alteraciones de aminoácidos apropiadas se pueden determinar evaluando una estructura tridimensional de una ADN polimerasa de interés (por ejemplo, ADN polimerasa original). Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos idénticas o similares a las descritas en las Tablas 2, 3 y 4 se pueden introducir en una ADN polimerasa. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos alternativas utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para aminoácidos conservativos y no conservativos como se establece, por ejemplo, mediante una matriz de intercambio de frecuencia estándar de Dayhoff o matriz BLOSUM. Se han clasificado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de clase III, como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. Como se usa en el presente documento, "sustitución no conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido de una clase por un aminoácido de otra clase; por ejemplo, la sustitución de una Ala, un residuo de clase II, por un residuo de clase III como Asp, Asn, Glu o Gln. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos.

Las alteraciones de aminoácidos apropiadas permitidas en posiciones relevantes se pueden confirmar sometiendo a prueba la actividad de las ADN polimerasas modificadas resultantes en los ensayos *in vitro* conocidos en la técnica o como se describe en los Ejemplos a continuación.

Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio) y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)), la mutagénesis en casete (Wells *et al.*, *Gene*, 34:315 (1985)), la mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)), la PCR inversa con mutaciones incluidas en la secuencia del cebador, u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el ADN clonado para producir las ADN polimerasas modificadas deseadas.

Las alteraciones incluyen modificaciones químicas que incluyen acetilación, acilación, amidación, ADP-ribosilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación o cualquier otro procedimiento similar.

Las ADN polimerasas modificadas pueden contener una o más alteraciones de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las descritas en las Tablas 2, 3, 4, 5, 8, 12 y 15. Las ADN polimerasas modificadas también pueden contener sustituciones, inserciones y/o delecciones adicionales independientes de las mutaciones observadas o seleccionadas en los experimentos de evolución dirigida. Por tanto, una ADN polimerasa modificada puede tener una secuencia de aminoácidos al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idéntica a una ADN polimerasa natural correspondiente. Una ADN polimerasa modificada puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones, delecciones, inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas, en relación con una forma natural de la polimerasa.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia modificada que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia original correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos es similar a la alineación con el propósito de determinar las posiciones correspondientes como se describe anteriormente.

Se pueden aplicar procedimientos bien conocidos en la técnica para expresar y aislar ADN polimerasas modificadas. Muchos vectores de expresión bacteriana contienen elementos de secuencia o combinaciones de elementos de secuencia que permiten una expresión inducible de alto nivel de la proteína codificada por una secuencia exógena. Por ejemplo, los vectores de expresión están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Novagen (<http://www.emdbiosciences.com/html/NVG/AllTables.html#>).

Como ejemplo, las bacterias que expresan una forma inducible integrada del gen de la ARN polimerasa de T7 se pueden transformar con un vector de expresión que porta un gen de la ADN polimerasa modificada conectado al promotor de T7. La inducción de la ARN polimerasa de T7 por adición de un inductor apropiado, por ejemplo, isopropil-p-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para un promotor inducible de *lac*, induce la expresión de alto nivel del gen quimérico del promotor de T7.

Un experto en la técnica puede seleccionar cepas huésped apropiadas de bacterias a partir de las disponibles en la técnica. Como ejemplo no limitante, se usa comúnmente la cepa BL-21 de *E. coli* para la expresión de proteínas exógenas, puesto que carece de proteasas con relación a otras cepas de *E. coli*. Para situaciones en las que el uso

de codón para el gen de polimerasa particular difiere de lo que se observa normalmente en genes de *E. coli*, existen cepas de BL-21 que se modifican para portar genes de ARNt que codifican ARNt con anticodones más raros (por ejemplo, genes de ARNt argU, ileY, leuW y proL), lo que permite una expresión de alta eficacia de los genes quiméricos clonados (varias cepas celulares BL21-CODON PLUSTM que portan ARNt con codón raro están disponibles de Stratagene, por ejemplo). De forma adicional o alternativa, los genes que codifican las ADN polimerasas se pueden optimizar con codón para facilitar la expresión en *E. coli*. Se pueden sintetizar químicamente secuencias optimizadas con codón.

Existen muchos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica que son adecuados para la purificación de una ADN polimerasa modificada de la invención. Por ejemplo, el procedimiento de Lawyer *et al.* (1993, *PCR Meth. & App.* 2: 275) es muy adecuado para el aislamiento de ADN polimerasas expresadas en *E. coli*, ya que fue diseñado originalmente para el aislamiento de la polimerasa Taq. De forma alternativa, se puede usar el procedimiento de Kong *et al.* (1993, *J. Biol. Chem.* 268: 1965), que emplea una etapa de desnaturalización térmica para destruir proteínas huésped, y dos etapas de purificación en columna (sobre columnas DEAE-Sepharose y Heparin-Sepharose) para aislar la ADN polimerasa altamente activa y con una pureza de aproximadamente un 80 %.

Además, se pueden aislar ADN polimerasas modificadas por fraccionamiento con sulfato de amonio, seguido de columnas Q Sepharose y celulosa-ADN, o por adsorción de contaminantes en una columna HiTrap Q, seguido de elución de gradiente de una columna de heparina HiTrap.

Aplicaciones de ADN polimerasas modificadas de la invención

Se pueden usar ADN polimerasas modificadas de la presente invención para cualquier procedimiento que implique síntesis de polinucleótidos. Los procedimientos de síntesis de polinucleótidos son bien conocidos por un experto en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Molecular Cloning, segunda edición, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989). Por ejemplo, las ADN polimerasas modificadas de la presente invención tienen una variedad de usos en tecnología de ADN recombinante incluyendo, pero sin limitarse a, marcaje de ADN por desplazamiento de mella, síntesis de ADNc bicatenario en clonación de ADNc, secuenciación de ADN, amplificación de genoma completo y amplificación, detección y/o clonación de secuencias de ácido nucleico usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En algunos modos de realización, la invención proporciona enzimas que son más adecuadas para la PCR usada en aplicaciones industriales o de investigación. PCR se refiere a un procedimiento *in vitro* para amplificar una secuencia molde de polinucleótido específica. La técnica de PCR se describe en numerosas publicaciones, incluyendo, PCR: A Practical Approach, M. J. McPherson, *et al.*, IRL Press (1991), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, por Innis, *et al.*, Academic Press (1990), y PCR Technology: Principals and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich, Stockton Press (1989). La PCR también se describe en muchas patentes de EE. UU., incluyendo las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; 4.889.818; 5.075.216; 5.079.352; 5.104.792; 5.023.171; 5.091.310; y 5.066.584.

Se espera que las ADN polimerasas modificadas con mayor procesividad, tasa de alargamiento, resistencia a sales y/o fidelidad mejoren la eficacia y la tasa de éxito de amplificación de largo alcance (mayor rendimiento, dianas más largas amplificadas) y reduzcan la cantidad de molde de ADN requerida.

Diversas aplicaciones específicas de amplificación por PCR están disponibles en la técnica (para revisiones, véase, por ejemplo, Erlich, 1999, *Rev Immunogenet.*, 1: 127-34; Prediger 2001, *Methods Mol. Biol.* 160: 49-63; Jurecic *et al.*, 2000, *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 316-21; Triglia, 2000, *Methods Mol. Biol.* 130: 79-83; MacLelland *et al.*, 1994, *PCR Methods Appl.* 4: S66-81; Abramson y Myers, 1993, *Current Opinion in Biotechnology* 4: 41-47).

Como ejemplos no limitantes, las ADN polimerasas modificadas descritas en el presente documento se pueden usar en aplicaciones de PCR incluyendo, pero no se limitan a, i) PCR de inicio en caliente ("*hot-start*") que reduce la amplificación inespecífica; ii) PCR con temperatura decreciente ("*touch-down*") que comienza a alta temperatura de hibridación, a continuación disminuye la temperatura de hibridación en etapas para reducir el producto de PCR inespecífico; iii) PCR con cebadores internos ("*nested*") que sintetiza un producto más fiable usando un conjunto externo de cebadores y un conjunto interno de cebadores; iv) PCR inversa para amplificación de regiones que flanquean una secuencia conocida. En este procedimiento, el ADN se digiere, el fragmento deseado se circulariza por fijación, a continuación PCR usando un cebador complementario para la secuencia conocida que se extiende hacia fuera; v) AP-PCR (cebado arbitrario) / RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatorio). Estos procedimientos crean huellas genómicas de especies con secuencias diana poco conocidas por amplificación usando oligonucleótidos arbitrarios; vi) RT-PCR que usa ADN polimerasa dirigida a ARN (por ejemplo, transcriptasa inversa) para sintetizar ADNc que a continuación se usa para PCR. Este procedimiento es extremadamente sensible para detectar la expresión de una secuencia específica en un tejido o células. También se puede usar para cuantificar los transcritos de ARNm; vii) RACE (rápida amplificación de extremos de ADNc). Esto se usa cuando la información sobre la secuencia proteica/de ADN es limitada. El procedimiento amplifica los extremos 3' o 5' de ADNc que generan fragmentos de ADNc con solo un cebador específico cada uno (más un cebador adaptador). A continuación se pueden combinar los productos de RACE solapantes para producir ADNc de longitud completa; viii) DD-PCR (PCR con

presentación diferencial) que se usa para identificar genes expresados diferencialmente en diferentes tejidos. Una primera etapa en DD-PCR implica RT-PCR, a continuación se realiza la amplificación usando cebadores cortos intencionadamente inespecíficos; ix) PCR múltiple en la que dos o más dianas únicas de secuencias de ADN en el mismo espécimen se amplifican simultáneamente. Se puede usar una secuencia de ADN como control para verificar la calidad de la PCR; x) Q/C-PCR (cuantitativa comparativa) que usa una secuencia de ADN control interna (pero de diferente tamaño) que compite con el ADN diana (PCR competitiva) por el mismo conjunto de cebadores; xi) PCR recursiva que se usa para sintetizar genes. Los oligonucleótidos usados en este procedimiento son complementarios a tramos de un gen (>80 bases), de forma alternativa a las hebras sentido y antisentido con extremos solapantes (-20 bases); xii) PCR asimétrica; xiii) PCR *in situ*; xiv) mutagénesis por PCR dirigida a sitio; xv) DOP-PCR que usa cebadores parcialmente degenerados para amplificación de genoma completo; xvi) PCR cuantitativa usando Verde SYBR o sondas de oligonucleótidos para detectar la amplificación; y xvii) PCR propensa a error en la que se optimizan las condiciones para obtener un incremento en el número de mutaciones en el producto de PCR.

Se debe entender que la presente invención no se limita a ningún sistema de amplificación particular. A medida que se desarrollen otros sistemas, esos sistemas se pueden beneficiar por la práctica de la presente invención.

Kits

La invención también contempla formatos de kit que incluyen una unidad de envase que tiene uno o más recipientes que contienen ADN polimerasas modificadas de la invención y composiciones de las mismas. En algunos modos de realización, la presente invención proporciona kits que incluyen además recipientes de diversos reactivos usados para la síntesis de polinucleótidos, incluyendo síntesis en PCR.

Los kits según la invención de acuerdo con la presente invención también pueden contener uno o más de los siguientes elementos: precursores de polinucleótidos, cebadores, tampones, instrucciones, aditivos de PCR y controles. Los kits pueden incluir recipientes de reactivos mezclados conjuntamente en proporciones adecuadas para realizar los procedimientos de acuerdo con la invención. Los recipientes de reactivos preferentemente contienen reactivos en cantidades unitarias que obvian las etapas de medición cuando se realizan los procedimientos objeto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Experimentos de evolución dirigida utilizando la polimerasa Taq

Para seleccionar enzimas mutadas que serían más adecuadas para las tecnologías de ADN recombinante, se diseña un experimento de evolución dirigida simplemente imitando las condiciones normales en las que se usa normalmente la enzima, o posiblemente en condiciones menos que perfectas, tal como se espera en aplicaciones reales. Después de llevar a cabo suficientes rondas de selección, debería aparecer una enzima (o múltiples enzimas) que sea más adecuada para aplicaciones típicas en tecnologías de ADN recombinante. Los detalles de los experimentos de evolución dirigida y las ventajas ejemplares de las mutaciones seleccionadas asociadas se describen en la solicitud pendiente titulada "ADN polimerasas modificadas" presentada en la misma fecha.

En particular, hemos realizado experimentos de evolución dirigida utilizando una ADN polimerasa tipo A, Taq. Se realizaron experimentos de evolución dirigida en colecciones de mutantes de Taq creadas por PCR propensa a error.

Se llevaron a cabo varias rondas de selección. Durante el transcurso de la selección en curso, es probable que muchas mutaciones diferentes confieran diferentes tipos de ventajas, en diferentes grados, ya sea solas o en combinación. Típicamente, durante las primeras rondas de selección no existen clones dominantes obvios, mientras que es probable que se eliminen las enormes cantidades de mutantes neutrales o desventajosos. Después de esto, una serie de mutaciones particulares aparecen típicamente en números más altos de lo esperado. Estas mutaciones están ahí porque tienen algunas ventajas.

Típicamente, se considera que las selecciones han funcionado cuando se han eliminado la gran cantidad de mutantes que se encuentran en el material de partida y el conjunto está dominado por unos pocos tipos o familias de mutantes restantes que han superado competitivamente a los otros mutantes y al tipo natural. En esta fase, no es necesario definir exactamente la naturaleza de la mejora que confieren las mutaciones. El hecho de que se seleccionaran es una prueba suficiente, especialmente si la misma mutación se vuelve dominante en las selecciones ejecutadas de forma independiente.

La selección adicional da como resultado que el número de algunas de estas mutaciones se incrementa en el conjunto, mientras que otras se pueden eliminar posiblemente porque tienen algunas ventajas pero no son suficientes para competir con los clones mejor adaptados. Al mismo tiempo, pueden aparecer algunos mutantes previamente desapercibidos. La aparición tardía de estos mutantes se podría deber al hecho de que estas mutaciones específicas estaban presentes en un número reducido en el conjunto inicial, o a que la mutación requería otra (o más de una) mutación en el mismo clon para que la ventaja se manifestara. Si las selecciones continúan aún más, finalmente es probable que algunos clones dominen sustancialmente. Típicamente, es importante aislar los clones antes de este punto final si es deseable aislar una amplia gama de mutaciones beneficiosas.

En experimentos particulares se generaron mutantes de alta procesividad y se cribaron para (1) resistencia a alto contenido de sal (KCl) en una reacción de PCR y/o (2) resistencia a altos niveles de tinte intercalante Verde SYBR I en una reacción de PCR. Se llevaron a cabo varias rondas de selección en Taq. Durante el transcurso de las selecciones en curso se observaron muchas mutaciones diferentes solas o en combinación en diversas posiciones. Se seleccionaron y secuenciaron los clones que exhibieron mayor tolerancia que el tipo natural a cualquiera de estas presiones. Las mutaciones ejemplares y las posiciones correspondientes se muestran en la Tabla 2. Los clones ejemplares que contienen diversas mutaciones o combinaciones de mutaciones se muestran en la Tabla 3 (en base a la resistencia a alto contenido de sales (KCl)) y en la Tabla 4 (en base a la resistencia a altos niveles de Verde SYBR I). Las enzimas que contienen una o más de estas mutaciones retienen la actividad enzimática. Un fenotipo general de estos clones seleccionados tiene una actividad específica más alta que la Taq natural y se caracterizan además por una variedad de fenotipos, como se describe en los Ejemplos adicionales a continuación.

Tabla 2. Mutaciones observadas en clones mutantes de Taq seleccionados por resistencia a alto contenido de sales o niveles altos de Verde SYBR

Posición	Mutación	Posición	Mutación
6	P6S	360	A360T
7	L7P	364	G364D
9	E9K	364	G364S
20	H20Q	368	P368L
26	T26M	400	E400K
27	F27S	404	E404G
30	L30P	413	F413L
39	E39K	414	A414T
41	V41A	419	R419H
50	S50N	468	A468T
53	K53N	471	E471G
56	K56Q	507	E507K
57	E57D	515	S515G
116	Y116C	518	V518A
151	D151N	578	D578N
171	K171R	604	W604R
203	T203I	631	V631A
209	E209G	636	R636H
209	E209K	649	V649A
225	K225R	651	R651H
238	D238N	684	I684V
245	L245M	690	Q690R
259	A259V	717	R717G
262	R262C	730	V730A
274	E274G	732	D732G
292	K292I	742	E742K
294	L294P	744	A744V
305	A305V	797	E797G
310	V310A	804	K804E
340	K340R	814	A814G

Tabla 3. Ejemplos de clones mutantes de Taq seleccionados para resistencia a alto contenido de sales

Nombre del clon	Mutaciones
A3E	T203I, D578N; E742K
G9S	T203I; G364S, D732G; E742K
D5S	P6S, T203I, K340R, E742K
D2	E9K, S50N, E209K, E507K
A5E	E39K; V41A; K53N, K56Q, E57D, V310A, P368L, A468T, E507K
B6S	F27S, K53N, K56Q, E57D, A259V, V310A, E507K, W604R
E2S	K53N, K56Q, E57D, D151N, E209G, A360T, E507K, Q690R
A3	K53N, K56Q, E57D, L245M, R262C, G364D, E507K, V518A
H10	K53N, K56Q, E57D, E507K, S515G
H1S	K53N, K56Q, E57D, R419H, E507K, S515G; V631A
F9E	K53N, K56Q, E57D, E507K, V649A
A5S	K53N, K56Q, E57D, E404G, E507K
C10E	H20Q, K53N, K56Q, E57D, K171R, K225R, K292I, A305V, E471G, E507K, A814G
F5S	L30P, K53N, K56Q, E57D, K171R, E274G, E507K
E7S	K53N, K56Q, E57D, E507K
G6S	T26M, K53N, K56Q, E57D, E507K, I684V
E1E	K53N, K56Q, E57D, F413L, E507K, R636H

Tabla 4. Ejemplos de clones mutantes de Taq seleccionados para resistencia a Verde SYBR

5

Nombre del clon	Mutaciones
C7	E507K, A744V, E797G
E12	P6S, L7P, E507K, R651H, V730A, E797G
D9	P6S, E507K, E797G, K804E
F10	D238N, L294P, E400K, E507K
H7	D238N, L294P, E400K, A414T, E507K
A5	Y116C, D238N, L294P, E400K, A414T, E507K, R717G

Ejemplo 2. Tipos de ventajas selectivas

10 Existe una amplia gama de ventajas que pueden haber sido seleccionadas, algunas de las cuales se enumeran y analizan a continuación:

1) Eficacia de expresión:

15 Los clones que expresan niveles más altos de la enzima tendrán una ventaja sobre aquellos que expresan menos. La actividad específica de la enzima mutada puede no haber mejorado, pero la actividad total sí lo hará. Esta característica es particularmente valiosa para la fabricación de enzimas porque permitirá incrementar los niveles de producción y/o reducir los costes de producción.

2) Solubilidad y robustez en el plegado:

20 Cuando se incrementa la solubilidad, la probabilidad de formación de cuerpos de inclusión disminuye. Por lo tanto, en estos clones, se expresa una proporción más alta de producto enzimático útil y correctamente plegado.

3) Termoestabilidad:

25 Es bien conocido que, durante el termociclado requerido para la PCR, una determinada fracción de la enzima se

inactiva debido al calentamiento. Una enzima que sea resistente a la inactivación por calor mantendrá la actividad durante más tiempo. Por lo tanto, se puede usar menos enzima y/o se pueden realizar más ciclos.

4) Actividad:

5

Los mutantes con mayor actividad enzimática proporcionan una polimerización más eficaz.

5) Procesividad:

10

Los mutantes con procesividad incrementada son capaces de sintetizar productos de PCR largos y sintetizar secuencias con una estructura secundaria compleja. Es probable que las enzimas mutantes que pueden incorporar más nucleótidos / etapa de extensión operen eficazmente a concentraciones más bajas.

6) Velocidad:

15

Los mutantes con mayor tasa de alargamiento proporcionan una polimerización más eficaz. Las enzimas que son rápidas también se pueden usar con tiempos de extensión más cortos. Esto es particularmente valioso para un sistema de alto rendimiento.

7) Solidez de concentración:

20

Es conocido que las reacciones de PCR pueden no llevarse a cabo adecuadamente si se usa demasiada o demasiada poca enzima. En las condiciones de selección que usamos, una polimerasa que puede generar productos apropiados, ya sea porque se suministre en exceso o en niveles bajos, tendrá una ventaja.

25

8) Resistencia a sales, aditivos de PCR y otros inhibidores:

30

La selección se llevó a cabo en presencia de sales, aditivos de PCR (por ejemplo, tintes intercalantes) y otras impurezas. La presencia de sales puede reducir la afinidad de unión a ADN de las polimerasas. La presencia de impurezas puede interferir con la formación de un producto de PCR deseado. Una polimerasa que sea resistente a sales e inhibidores y que pueda sintetizar los productos deseados es ventajosa y se seleccionará. La característica es particularmente adecuada para aplicaciones en las que la PCR se usa en muestras en bruto.

9) Fidelidad:

35

Todas las polimerasas cometen errores durante la replicación, ya sea incorporando el dNTP incorrecto o por titubeo que causa deleciones e inserciones. Dichos errores pueden eliminar los genes funcionales durante la selección, por lo que existe una presión para que no se cometan errores. Una polimerasa con fidelidad más alta es ventajosa y se seleccionará.

40

10) Actividad de desplazamiento de hebra:

45

La estructura secundaria del ADN debida a un autohibridación intramolecular puede inhibir el alargamiento de la hebra de ADN catalizado por la polimerasa. De forma similar, la rehibridación parcial del ADN complementario además del cebador inhibirá la PCR. Cualquier enzima con actividad mejorada de desplazamiento de hebra tendrá una ventaja en la selección.

11) Tolerancia al pirofosfato:

50

El pirofosfato se libera durante la incorporación de nucleótidos a la hebra naciente por las polimerasas. La acumulación de pirofosfato puede dar lugar a la inhibición de la actividad polimerasa. Las polimerasas que se seleccionaron para el ejemplo de evolución dirigida pueden haber evolucionado para verse menos afectadas por la inhibición del pirofosfato.

55

12) Desconocido:

Existen muchos otros factores implicados en el proceso de PCR. Las enzimas que están mejor adaptadas a la PCR por cualquier motivo se pueden seleccionar en nuestras condiciones de selección.

60

Determinados clones y mutaciones seleccionados se caracterizan además por una variedad de fenotipos. Hasta ahora, hemos realizado pruebas para algunos fenotipos diferentes: procesividad, capacidad para sintetizar fragmentos grandes y tolerancia a los inhibidores. Las pruebas para examinar los fenotipos se describen en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 3. Ensayos de unión a heparina

65

Para someter a prueba la procesividad de los mutantes de Taq seleccionados, usamos ensayos de unión a heparina.

La heparina es un miembro de la familia de carbohidratos de glicosaminoglicanos (que incluye la molécula estrechamente relacionada sulfato de heparano) y consiste en una unidad de disacárido que se repite de forma variable sulfatada. Los polímeros de heparina forman una estructura helicoidal y se cree que las enzimas que procesan el ADN se unen a la heparina en los mismos puntos de contacto que se unen al ADN bicatenario. Por tanto, la afinidad de unión al ADN se puede medir en base a los ensayos de unión a heparina. En resumen, a pH fisiológico, los grupos sulfato están desprotonados. La carga negativa y la estructura helicoidal imitan la estructura y la carga del ADN, permitiendo la unión de las proteínas de unión a ADN a la heparina. Las ADN polimerasas contienen una serie de residuos de aminoácidos cargados positivamente que están implicados en la unión de la enzima al ADN. Esta propiedad se puede utilizar durante la purificación de polimerasas, con lo que la polimerasa se une a la heparina que se acopla covalentemente a perlas de agarosa. La afinidad de unión de la polimerasa se determina por el número y la fuerza de las interacciones de unión. La polimerasa eluye incrementando la cantidad de sal en el tampón de elución. Los enlaces iónicos entre la polimerasa y la heparina se romperán al añadir una concentración creciente de sal. La concentración de sal a la que eluye la enzima es, por lo tanto, indicativa de la afinidad de unión de la polimerasa por la heparina y el ADN.

En particular, los sedimentos de células de *E. coli* que contenían mutantes de Taq se lisaron en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM (tampón de unión). Los lisados se incubaron durante 30 min a 75 °C para desnaturalizar las proteínas de *E. coli*, seguido de centrifugación a 20.000 x g durante 20 min a 20 °C. El sobrenadante se cargó en una columna HiTrap Heparin (GE Healthcare) y se eluyó en un gradiente de NaCl de 0,15 a 2 M. La conductividad (mS/cm) en el pico de elución se registró como una medida de la concentración de sal del eluido. Una alta conductividad indica una alta afinidad de la polimerasa por la heparina y el ADN. La conductividad en el pico de elución de la polimerasa Taq fue de 38,3 mS/cm (véase la Tabla 5). La conductividad para mutantes de polimerasa de baja afinidad estaba por debajo de 38 mS/cm. La conductividad de determinados mutantes de polimerasa de alta afinidad estaba entre 46,7 y 54,4 mS/cm (véase la Tabla 5).

La conductividad es proporcional a la cantidad de sal en una solución. Determinamos empíricamente la correlación entre la concentración de sal y la conductividad. Usamos el tampón de unión y el tampón de elución en diversas proporciones (concentraciones finales de 200 a 700 mM de NaCl) y medimos la conductividad. Representamos la conductividad frente a la concentración de NaCl. El análisis de regresión lineal reveló que la conductividad (Cd) se puede expresar como $Cd = 0,084 \times Cs + 7,26$ ($R^2 = 0,9995$), donde Cs es la concentración de NaCl. A partir de esto, calculamos que la polimerasa Taq eluyó a una concentración de NaCl de aproximadamente 370 mM, y los mutantes eluyeron a una concentración de NaCl de aproximadamente entre 470 y 561 mM.

Tabla 5. Conductividad de los clones de Taq

Clon:	Conductividad del pico principal (mS/cm):
Taq natural	38,3
A3E	48,2
G9S	46,7
D5S	46,8
D2	54,4
A5E	50,0
B6S	50,2
E2S	52,7
A3	48,9
H10	49,5
H1S	49,6
F9E	49,9
A5S	50,7
C10E	50,4
F5S	49,7
E7S	49,8
G6S	50,4
E1E	50,2
C7	47,4

Clon:	Conductividad del pico principal (mS/cm):
E12	50,0
D9	49,8
F10	50,4
H7	51,6
A5	51,1

Ejemplo 4. Capacidad de generar largos fragmentos de PCR

5 Los pares de cebadores se diseñaron para generar un fragmento de un molde ADN lambda de 5 kb, 8 kb o 10 kb. Cada una de las enzimas de alta procesividad, a una concentración de enzima limitante, se sometió a prueba para determinar su capacidad de amplificar cada una de las longitudes de los amplicones.

Los cebadores ejemplares incluyen el cebador directo

10 L30350F: 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3' (SEQ ID NO:28) y cebadores inversos como sigue:

L-5R: 5'-CGAACGTGCGCAGAGAAACAGG-3' (SEQ ID NO:29)

15 L-8R: 5'-GCCTCGTTGCGTTTGTTCACGC-3' (SEQ ID NO:30)

L-10R: 5'-GCACAGAAGCTATTATGCGTCCCCAGG-3' (SEQ ID NO:31)

20 Los componentes de reacción para los ensayos se muestran en la Tabla 6. El perfil del ciclado para estas reacciones se muestra en la Tabla 7.

Tabla 6. Componentes de reacción ejemplares

Componente de reacción	Concentración		en 20 µl
Agua de PCR	-	-	16,185
10x tampón Kapa A con tinte de carga	10	x	2,00
MgCl ₂ (suplemento a 2 mM para un incremento de los dNTP)	25	mM	0,40
dNTP	10	mM cada uno	0,80
Cebador L30350-F	100	µM	0,10
Cebador inverso	100	µM	0,10
ADN lambda	300	ng/µl	0,015
Cada ADN polimerasa	20	ng/µl	0,40
TOTAL			20,00

Tabla 7. Perfil de ciclado ejemplar

25

Perfil de ciclado:

Ciclo	N.º	Temp (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	1	95	2	min
Desnaturalización	25	95	30	s
Hibridación / Extensión	25	72	6	min
Alargamiento final	1	72	6	min
Mantenimiento (HOLD)	1	4	Indefinido	

Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa y se evaluaron para determinar la presencia o ausencia de una banda en el tamaño de fragmento apropiado. Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 8.

30

Tabla 8. Fragmentos producidos por clones de Taq

Nombre del clon:	5 kb	8 kb	10 kb
Taq natural	no	no	no
A3E	sí	sí	no
G9S	no	no	no
D5S	no	no	no
D2	sí	sí	sí
A5E	sí	sí	no
B6S	sí	no	no
E2S	sí	sí	sí
A3	no	no	no
H10	sí	no	no
H1S	no	no	no
F9E	sí	no	no
A5S	sí	no	no
C10E	sí	sí	sí
F5S	sí	no	no
E7S	sí	no	no
G6S	sí	no	no
E1E	no	no	no
C7	no	no	no
E12	sí	sí	no
D9	sí	sí	no
F10	sí	sí	sí
H7	sí	sí	sí
A5	sí	sí	no

Ejemplo 5. Tolerancia a alto contenido de sales

5 Los clones de Taq de alta procesividad se sometieron a prueba para determinar la capacidad de amplificar un amplicón de PCR de 2 kb en presencia de alto contenido de sales. Las reacciones se realizaron en un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,4 a 25 °C) y KCl 150 mM o NaCl 150 mM. Los componentes de reacción ejemplares para ensayos con KCl 150 mM y NaCl 150 mM se muestran en las Tablas 9 y 10, respectivamente. El perfil de ciclado ejemplar para estos ensayos se muestra en la Tabla 11.

Los cebadores ejemplares incluyen el cebador directo

L30350F: 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3' (SEQ ID NO:28) y cebador inverso

L-2R: 5'-CCATGATTCAGTGTGCCCGTCTGG-3' (SEQ ID NO:32).

Tabla 9. Componentes de reacción ejemplares para ensayos con KCl 150 mM

KCl 150 mM		Volumen de reacción =	25
Componente de reacción	Concentración		en 25 µl
Agua de PCR	-	-	15,967
100x Tris-HCl, pH 8,4	100	x	0,250
MgCl2 (suplemento a 1,5 mM)	25	mM	1,50

KCl 150 mM		Volumen de reacción =	25
Componente de reacción	Concentración		en 25 µl
dNTP	10	mM cada uno	0,50
KCl	2500	mM	1,50
Cebador L30350-F	100	µM	0,125
Cebador L-2R	100	µM	0,125
ADN lambda	300	ng/µl	0,033
ADN polimerasa Taq	20	ng/µl	5,00
TOTAL			25,00

Tabla 10. Componentes de reacción ejemplares para ensayos con NaCl 150 mM

NaCl 150 mM		Volumen de reacción =	25
Componente de reacción	Concentración		en 25 µl
Agua de PCR	-	-	15,967
100x Tris-HCl, pH 8,4	100	x	0,25
MgCl ₂ (suplemento a 1,5 mM)	25	mM	1,50
dNTP	10	mM cada uno	0,50
NaCl	2500	mM	1,50
Cebador L30350-F	100	µM	0,125
Cebador L-2R	100	µM	0,125
ADN lambda	300	ng/µl	0,033
ADN polimerasa Taq	20	ng/µl	5,00
TOTAL			25,00

5 **Tabla 11. Perfil de ciclado ejemplar (condiciones de alto contenido de sales)**

Perfil de ciclado:				
Ciclo	N.º	Temp (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	1	95	2	min
Desnaturalización	35	95	30	s
Hibridación / Extensión	35	72	2	min
Alargamiento final	1	72	2	min
Mantenimiento (HOLD)	1	4	Indefinido	

Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa y se evaluaron para determinar la presencia o ausencia de una banda en el tamaño de fragmento apropiado. Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 12.

10

Tabla 12. Fragmentos producidos por clones de Taq (condiciones de alto contenido de sales)

<u>Nombre del clon:</u>	<u>KCl 150 mM</u>	<u>NaCl 150 mM</u>
Taq natural	no	no
A3E	sí	no
G9S	sí	no

Nombre del clon:	KCl 150 mM	NaCl 150 mM
D5S	sí	sí
D2	sí	sí
A5E	sí	sí
B6S	sí	sí
E2S	sí	sí
A3	sí	sí
H10	no	no
H1S	sí	no
F9E	sí	sí
A5S	sí	sí
C10E	sí	sí
F5S	sí	sí
E7S	sí	sí
G6S	sí	sí
E1E	sí	sí
C7	no	no
E12	sí	sí
D9	sí	sí
F10	sí	sí
H7	sí	sí
A5	sí	sí

Ejemplo 6. Resistencia al fenol

5 Los clones de Taq de alta procesividad se sometieron a prueba para determinar la capacidad de amplificar un amplicón de PCR de 2 kb en presencia de fenol al 1 %. Las reacciones se realizaron en un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,4 a 25 °C) y fenol al 1 %. Los componentes de reacción para estos ensayos se muestran en la Tabla 13. El perfil de ciclado para estos ensayos se muestra en la Tabla 14.

Tabla 13. Componentes de reacción ejemplares (condiciones de alto contenido de fenol)

10

1 % de fenol		Volumen de reacción =	25
Componente de reacción	Concentración		en 25 µl
Agua de PCR	-	-	16,467
10x tampón Kapa A con tinte de carga + MgCl ₂	10	x	2,50
MgCl ₂	25	mM	0,00
dNTP	10	mM cada uno	0,50
Fenol	100	%	0,25
Cebador L30350-F	100	µM	0,125
Cebador L-2R	100	µM	0,125
ADN lambda	300	ng/µl	0,033
ADN polimerasa Taq	20	ng/µl	5,00
TOTAL			25,00

Tabla 14. Perfil de ciclado ejemplar (condiciones de alto contenido de fenol)

Perfil de ciclado:				
Ciclo	N.º	Temp (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	1	95	2	min
Desnaturalización	35	95	30	s
Hibridación / Extensión	35	72	2	min
Alargamiento final	1	72	2	min
Mantenimiento (HOLD)	1	4	Indefinido	

- 5 Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa y se evaluaron para determinar la presencia o ausencia de una banda en el tamaño de fragmento apropiado. Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Fragmentos producidos por clones de Taq (condiciones de alto contenido de fenol)

<u>Nombre del clon:</u>	<u>1 % de fenol</u>
Taq natural	no
A3E	sí
G9S	no
D5S	sí
D2	sí
A5E	sí
B6S	no
E2S	no
A3	sí
H10	sí
H1S	sí
F9E	sí
A5S	sí
C10E	sí
F5S	sí
E7S	sí
G6S	sí
E1E	no
C7	sí
E12	no
D9	no
F10	sí
H7	sí
A5	no

Tabla 16. Secuencias

Secuencias de aminoácidos de las polimerasas Taq y Taq modificadas

> Natural (SEQ ID NO:1)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKEDGDAVIVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIITADKDLYQLLS
 DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGIKEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRELRRAFLEFGLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERLVFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLS SSSDPNLQNIPVTRPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKSVR EAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> A3E (SEQ ID NO:2)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKEDGDAVIVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIITADKDLYQLLS
 DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGIKEKIARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRELRRAFLEFGLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERLVFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLS SSSNPNLQNIPVTRPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKSVR KAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> G9S (SEQ ID NO:3)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKEDGDAVIVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIITADKDLYQLLS
 DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGIKEKIARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRELRRAFLEFGLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALRESLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERLVFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLS SSSDPNLQNIPVTRPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPGLEARVKSVR KAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> D5S (SEQ ID NO:4)

MRGMSLFPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKEDGDAVIVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIITADKDLYQLLS
 DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGIKEKIARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRELRRAFLEFGLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERLVFDELGLPAIGKTEKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLS SSSDPNLQNIPVTRPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKSVR KAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> D2 (SEQ ID NO:5)

MRGMPLPFKPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFANLLKALKEDGDVAIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLASLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGEKTKARKLLKEWGSLEALLKNLDRK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLRYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> A5E (SEQ ID NO:6)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGKPAQAVYGFAKSLLNALQDDGDVAIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLASLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGEKTKARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFALS RKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLRYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEITRLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> B6S (SEQ ID NO:7)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTSHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDVAIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLASLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGEKTKARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFVKKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFALS RKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLRYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGRLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> E2S (SEQ ID NO:8)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDVAIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLASLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
NRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGEKTKARKLLGEWGSLEALLKNLDRK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLTTLREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLRYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAPIYEEARAF IERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> A3 (SEQ ID NO:9)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDVAIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFPRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLASLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPHEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGEKTKARKLLEEWGSLEALLKNLDRK
PAIREKILAHMDDLKLSWDMKVRTDLPLEVDFAKRCEPDREERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREDLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLRYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAALAEALREA
HPIVEKILQYRELTKLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSFPKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> H10 (SEQ ID NO:10)

MRGMPLLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTGAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EG VYP LAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> H1S (SEQ ID NO:11)

MRGMPLLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGHLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTGAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRAFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EG VYP LAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> F9E (SEQ ID NO:12)

MRGMPLLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFGAPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EG VYP LAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> A5S (SEQ ID NO:13)

MRGMPLLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPEGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGGRAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EG VYP LAVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> C10E (SEQ ID NO:14)

MRGMPLLFEPKGRVLLVDGQHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVIVVFDKAPSFRH
EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDYQLLS
DRIHVLHPEGYLITPAWLWERYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLR
PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
PPEGVFGVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
LDVAYLRALSLEVAEEIARLGAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVFQEGRDIHTETASWMFVGP REAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
HRLSQELAIPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EG VYP LGVP LEVEVGIGE
DWLSAKE*

> F5S (SEQ ID NO:15)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHAPKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVI VVFDKAP SFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRI LTADKDLYQLLS
 DRIHVLHP EGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLP LEVDFAKRREPDRERLRAF LGRLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HP IVEKILQYRELTCLKSTYIDPLD LIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVQEGRDIHTETASWMF GVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPEYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> E7S (SEQ ID NO:16)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVI VVFDKAP SFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRI LTADKDLYQLLS
 DRIHVLHP EGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLP LEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HP IVEKILQYRELTCLKSTYIDPLD LIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVQEGRDIHTETASWMF GVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPEYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> G6S (SEQ ID NO:17)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYR MFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVI VVFDKAP SFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRI LTADKDLYQLLS
 DRIHVLHP EGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLP LEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HP IVEKILQYRELTCLKSTYIDPLD LIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVQEGRDIHTETASWMF GVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAVPYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> E1E (SEQ ID NO:18)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLNALQDDGDAVI VVFDKAP SFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRI LTADKDLYQLLS
 DRIHVLHP EGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLP LEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLLANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HP IVEKILQYRELTCLKSTYIDPLD LIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVQEGRDIHTETASWMF GVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPEYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> C7 (SEQ ID NO:19)

MRGMPLPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFAKSLLKALKEDGDAVI VVFDKAP SFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGYEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRI LTADKDLYQLLS
 DRIHVLHP EGYLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKGI GEKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLP LEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEP YKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HP IVEKILQYRELTCLKSTYIDPLD LIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVLAHLSG DENLIRVQEGRDIHTETASWMF GVPREAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAIPEYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEK TLEEGRRRGYVETLFGRRRYVPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRL EEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAGAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> E12 (SEQ ID NO:20)

MRGMLSPFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVAVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDLYQLLS
 DRIHVLHPPEGLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGI EKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVL AHLSGDENLIRVFQEGRDIHTE TASWMFVGPHEAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYAPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRLEEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAGAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> D9 (SEQ ID NO:21)

MRGMLSLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVAVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDLYQLLS
 DRIHVLHPPEGLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGI EKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVL AHLSGDENLIRVFQEGRDIHTE TASWMFVGPHEAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYAPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRLEEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAGAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> F10 (SEQ ID NO:22)

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVAVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDLYQLLS
 DRIHVLHPPEGLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGI EKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVL AHLSGDENLIRVFQEGRDIHTE TASWMFVGPHEAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYAPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRLEEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> H7 (SEQ ID NO:23)

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVAVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDLYQLLS
 DRIHVLHPPEGLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGI EKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVL AHLSGDENLIRVFQEGRDIHTE TASWMFVGPHEAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYAPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRLEEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

> A5 (SEQ ID NO:24)

MRGMLPLFEPKGRVLLVDGHHLAYRTFHALKGLTTSRGEVPQAVYGFSAKSLKALKEDGDVAVVFDKAPSFRH
 EAYGGYKAGRAPTPEDFRQLALIKELVDLLGLARLEVPGEADDVLA SLAKKAEKEGYEVRIILTADKDLYQLLS
 DRIHVLHPPEGLITPAWLWEKYGLRPDQWADYRALTGDESDNLPGVKIGI EKTARKLLEEWGSLEALLKNLDRLK
 PAIREKILAHMDDLKLSWDLAKVRTDLPLEVDFAKRREPDRERLRAF LERLEFGSLLHEFGLLLESPKALEEAPWP
 PPEGAFVGFVLSRKEPMWADLLALAAARGGRVHRAPEPYKALRDLKEARGLLAKDLSVLALREGLGLPPGDDPML
 LAYLLDP SNTTPEGVARRYGGEWTEEAGERAAALSERLFANLWGRLEGEERLLWLYREVERPLSAVLAHMEATGVR
 LDVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFR LAGHPFNLSRDQLERVLFDLGLPAIGKTKKTGKRSTSAAVLEALREA
 HPIVEKILQYRELTCLKSTYIDPLDLIHPRTGRLHTRFNQTATATGRLSSSDPNLQNI PVRTPLGQRIRRAFIA
 EEGWLLVALDYSQIELRVL AHLSGDENLIRVFQEGRDIHTE TASWMFVGPHEAVDPLMRRAAKTINFGVLYGMSA
 HRLSQELAPIYEEAQAF IERYFQSF PKVRAWIEKTL EEGRRRGYVETLFGRRRYAPDLEARVKS VREAAERMAFN
 MPVQGTAA DLMK LAMVKLFPRLEEMGARM L LQVHDELVL EAPKERAEAVARLAKEVM EGVYPLAVP LEVEVGIGE
 DWLSAKE*

Los artículos "un", "una" y "el/la", como se usan en el presente documento, en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, se debe entender que incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son pertinentes de otro modo para un producto o procedimiento dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. La invención incluye modos de realización en los que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en o es pertinente de otro modo para un producto o procedimiento dado. La invención también incluye modos de realización en los que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son pertinentes de otro modo para un producto o procedimiento dado. Además, se debe entender que la invención abarca variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc. de una o más de las reivindicaciones se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación de base (o, si resulta pertinente, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique de otro modo o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que surgiría una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo de Markush o similar, se debe entender que también se divulga cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento se puede retirar del grupo. Se debe entender que, en general, cuando la invención, o aspectos de la invención, se refiera(n) a comprender elementos, rasgos, etc., particulares, determinados modos de realización de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, dichos elementos, rasgos, etc. Para los propósitos de simplicidad, esos modos de realización no se han expuesto específicamente en cada caso en el presente documento. También se debe entender que cualquier modo de realización de la invención, por ejemplo, cualquier modo de realización encontrado dentro de la técnica anterior, se puede excluir explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la memoria descriptiva.

También se debe entender que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier procedimiento reivindicado en el presente documento que incluya más de un acto, el orden de los actos del procedimiento no se limita necesariamente al orden en el que se enumeran los actos del procedimiento, sino que la invención incluye modos de realización en los que el orden está así limitado. Además, cuando las reivindicaciones recitan una composición, la invención abarca procedimientos de uso de la composición y procedimientos de preparación de la composición.

Cuando las reivindicaciones recitan una composición, se debe entender que la invención abarca procedimientos de uso de la composición y procedimientos de preparación de la composición.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Kapa Biosistemas
 Bourn, William
 Appel, Maryke
 Rush, Gavin
 Foskett, John
 McEwan, Paul

10 <120> ADN polimerasas de tipo A modificadas
 <130> 2006735-0014

15 <150> 61/110.877
 <151> 03/11/2008

<160> 32

20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 832
 <212> PRT
 <213> *Thermus aquaticus*

25 <400> 1

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro

ES 2 742 800 T3

165 170 175

Asp Glu Trp Ala 180 Asp Tyr Arg Ala Leu 185 Thr Gly Asp Glu Ser 190 Asp Asn

Leu Pro Gly Val 195 Lys Gly Ile Gly 200 Glu Lys Thr Ala Arg 205 Lys Leu Leu

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu 215 Ala Leu Leu Lys Asn 220 Leu Asp Arg Leu

Lys Pro Ala Ile Arg Glu 230 Lys Ile Leu Ala His 235 Met Asp Asp Leu Lys 240

Leu Ser Trp Asp Leu 245 Ala Lys Val Arg Thr 250 Asp Leu Pro Leu Glu Val 255

Asp Phe Ala Lys 260 Arg Arg Glu Pro Asp 265 Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe 270

Leu Glu Arg 275 Leu Glu Phe Gly Ser 280 Leu Leu His Glu Phe 285 Gly Leu Leu

Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu 295 Glu Ala Pro Trp Pro 300 Pro Pro Glu Gly

Ala Phe Val Gly Phe Val 310 Leu Ser Arg Lys Glu 315 Pro Met Trp Ala Asp 320

Leu Leu Ala Leu Ala 325 Ala Ala Arg Gly Gly 330 Arg Val His Arg Ala Pro 335

Glu Pro Tyr Lys 340 Ala Leu Arg Asp Leu 345 Lys Glu Ala Arg Gly 350 Leu Leu

Ala Lys Asp 355 Leu Ser Val Leu Ala 360 Leu Arg Glu Gly Leu 365 Gly Leu Pro

Pro Gly 370 Asp Asp Pro Met Leu 375 Leu Ala Tyr Leu Leu 380 Asp Pro Ser Asn

Thr Thr Pro Glu Gly Val 390 Ala Arg Arg Tyr Gly 395 Gly Glu Trp Thr Glu 400

Glu Ala Gly Glu Arg 405 Ala Ala Leu Ser Glu 410 Arg Leu Phe Ala Asn Leu 415

Trp Gly Arg Leu 420 Glu Gly Glu Glu Arg 425 Leu Leu Trp Leu Tyr 430 Arg Glu

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly

ES 2 742 800 T3

435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
 690 695 700
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val

ES 2 742 800 T3

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125
 Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140
 Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Ile Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

ES 2 742 800 T3

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asn Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655

ES 2 742 800 T3

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 3

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 3

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val

ES 2 742 800 T3

Met Arg Gly Met Leu Ser Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Ile Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
260 265 270

ES 2 742 800 T3

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Arg Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

ES 2 742 800 T3

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

- 5 <210> 5
- <211> 832
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

ES 2 742 800 T3

<400> 5

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Lys Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45

Lys Asn Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205

Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu

ES 2 742 800 T3

755

760

765

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 6

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 6

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Lys Pro Ala Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

ES 2 742 800 T3

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Ala Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Leu
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430

ES 2 742 800 T3

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Thr Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
 690 695 700

ES 2 742 800 T3

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 7

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 7

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Ser His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu

ES 2 742 800 T3

100	105	110
Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp 115 120	Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys 125	
Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp 130 135 140		
Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly 145 150 155 160		
Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro 165 170 175		
Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn 180 185 190		
Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu 195 200 205		
Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu 210 215 220		
Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys 225 230 235 240		
Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val 245 250 255		
Asp Phe Val Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe 260 265 270		
Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu 275 280 285		
Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly 290 295 300		
Ala Phe Val Gly Phe Ala Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp 305 310 315 320		
Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro 325 330 335		
Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu 340 345 350		
Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro 355 360 365		
Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn		

ES 2 742 800 T3

370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
385 390 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
420 425 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Arg Leu Leu Val Ala
595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro

ES 2 742 800 T3

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

- <210> 8
- <211> 832
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*
- <400> 8

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

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 785 790 795 800

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

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

<210> 9

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 9

ES 2 742 800 T3

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Met Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Cys Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe

ES 2 742 800 T3

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 10

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

5

ES 2 742 800 T3

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 11
<211> 832
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 11

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly

ES 2 742 800 T3

420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Gly Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Ala Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg

ES 2 742 800 T3

690

695

700

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 12

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 12

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

ES 2 742 800 T3

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
275 280 285

Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
325 330 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
355 360 365

ES 2 742 800 T3

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

ES 2 742 800 T3

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Ala Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 13
<211> 832
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 13

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala

ES 2 742 800 T3

580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 14

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 14

ES 2 742 800 T3

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly Gln His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Arg Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

ES 2 742 800 T3

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Ile Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Val Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Gly Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

ES 2 742 800 T3

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

- 5 <210> 15
- <211> 832
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 742 800 T3

<220>

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

5 <400> 15

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Pro Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu

ES 2 742 800 T3

740

745

750

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 16
<211> 832
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 16

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

ES 2 742 800 T3

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

ES 2 742 800 T3

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685

ES 2 742 800 T3

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 17
<211> 832
<212> PRT
<213> *Thermus aquaticus*

5

<400> 17

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Met Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Asn Ala Leu Gln Asp Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

10

ES 2 742 800 T3

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285

Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365

ES 2 742 800 T3

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

ES 2 742 800 T3

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 18
<211> 832
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 18

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly His Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 785 790 795 800

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

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

<210> 19
 <211> 832
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10 <400> 19

ES 2 742 800 T3

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

ES 2 742 800 T3

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

ES 2 742 800 T3

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Gly Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

- 5 <210> 20
- <211> 832
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 742 800 T3

<220>

<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

5 <400> 20

Met Arg Gly Met Leu Ser Pro Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

ES 2 742 800 T3

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

ES 2 742 800 T3

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

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

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

ES 2 742 800 T3

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Gly Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

<210> 21
<211> 832
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 21

Met Arg Gly Met Leu Ser Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

ES 2 742 800 T3

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175
 Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190
 Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205
 Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

ES 2 742 800 T3

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560
 His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640
 Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670
 Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685

ES 2 742 800 T3

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Gly Ala Val Ala
785 790 795 800

Arg Leu Ala Glu Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
805 810 815

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

<210> 22

<211> 832

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

<400> 22

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

ES 2 742 800 T3

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asn Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
275 280 285

Glu Ser Pro Lys Ala Pro Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
325 330 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
355 360 365

ES 2 742 800 T3

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Lys
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

ES 2 742 800 T3

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

<210> 23
 <211> 832
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10

<400> 23

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 25 30

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Lys
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Thr Asn Leu
 405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510

ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575

ES 2 742 800 T3

Ser Asp Pro Asn₅₈₀ Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala₆₀₀ Glu Glu Gly Trp Leu₆₀₅ Leu Val Ala
 Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu₆₁₅ Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly₆₃₅ Arg Asp Ile His Thr
 Glu Thr Ala Ser Trp₆₄₅ Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 Leu Met Arg Arg₆₆₀ Ala Ala Lys Thr Ile₆₆₅ Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 Met Ser Ala₆₇₅ His Arg Leu Ser Gln₆₈₀ Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe₇₀₀ Pro Lys Val Arg
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr₇₁₀ Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
 Glu Thr Leu Phe Gly₇₂₅ Arg Arg Arg Tyr Val₇₃₀ Pro Asp Leu Glu Ala Arg
 Val Lys Ser Val₇₄₀ Arg Glu Ala Ala Glu₇₄₅ Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
 Val Gln Gly₇₅₅ Thr Ala Ala Asp Leu₇₆₀ Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met₇₇₅ Gly Ala Arg Met Leu₇₈₀ Leu Gln Val His
 Asp Glu Leu Val Leu Glu₇₉₀ Ala Pro Lys Glu Arg₇₉₅ Ala Glu Ala Val Ala
 Arg Leu Ala Lys Glu₈₀₅ Val Met Glu Gly Val₈₁₀ Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 Leu Glu Val Glu₈₂₀ Val Gly Ile Gly Glu₈₂₅ Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 830

<210> 24
 <211> 832
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polimerasa Taq modificada de *Thermus aquaticus*

10 <400> 24

ES 2 742 800 T3

Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
85 90 95

Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
100 105 110

Val Pro Gly Cys Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
145 150 155 160

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

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asn Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
245 250 255

ES 2 742 800 T3

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270
 Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Ser Pro Lys Ala Pro Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300
 Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335
 Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380
 Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Lys
 385 390 395 400
 Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Thr Asn Leu
 405 410 415
 Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445
 Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480
 Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495
 Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Lys Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510
 Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

ES 2 742 800 T3

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
595 600 605

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

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
785 790 795 800

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

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

5 <210> 25
<211> 831
<212> PRT
<213> *Thermus thermophilus*

ES 2 742 800 T3

<400> 25

Met Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Val
1 5 10 15

Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly Leu
20 25 30

Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala Lys
35 40 45

Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Val Val Val Val Val
50 55 60

Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala
85 90 95

Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Val
100 105 110

Pro Gly Phe Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys Arg Ala
115 120 125

Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg Asp Leu
130 135 140

Tyr Gln Leu Leu Ser Glu Arg Ile Ala Ile Leu His Pro Glu Gly Tyr
145 150 155 160

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

Gln Trp Val Asp Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Asp Pro Ser Asp Asn Ile
180 185 190

Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Gln Arg Leu Ile Arg
195 200 205

5

ES 2 742 800 T3

Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Phe Gln His Leu Asp Gln Val Lys
 210 215 220
 Pro Ser Leu Arg Glu Lys Leu Gln Ala Gly Met Glu Ala Leu Ala Leu
 225 230 235 240
 Ser Arg Lys Leu Ser Gln Val His Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val Asp
 245 250 255
 Phe Gly Arg Arg Arg Thr Pro Asn Leu Glu Gly Leu Arg Ala Phe Leu
 260 265 270
 Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu Glu
 275 280 285
 Gly Pro Lys Ala Ala Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala
 290 295 300
 Phe Leu Gly Phe Ser Phe Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp Ala Glu Leu
 305 310 315 320
 Leu Ala Leu Ala Gly Ala Trp Glu Gly Arg Leu His Arg Ala Gln Asp
 325 330 335
 Pro Leu Arg Gly Leu Arg Asp Leu Lys Gly Val Arg Gly Ile Leu Ala
 340 345 350
 Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Asp Leu Phe Pro
 355 360 365
 Glu Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn Thr
 370 375 380
 Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu Asp
 385 390 395 400
 Ala Gly Glu Arg Ala Leu Leu Ala Glu Arg Leu Phe Gln Thr Leu Lys
 405 410 415
 Glu Arg Leu Lys Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Glu Glu Val
 420 425 430
 Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala Arg Met Glu Ala Thr Gly Val
 435 440 445
 Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu Val Glu Ala
 450 455 460
 Glu Val Arg Gln Leu Glu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His Pro
 465 470 475 480

ES 2 742 800 T3

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

ES 2 742 800 T3

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

Pro Arg Leu Gln Glu Leu Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp
770 775 780

Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Asp Arg Ala Glu Arg Val Ala Ala
785 790 795 800

Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Trp Pro Leu Gln Val Pro Leu
805 810 815

Glu Val Glu Val Gly Leu Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
820 825 830

<210> 26
<211> 834
<212> PRT
<213> *Thermus* sp.

5

<400> 26

Met Glu Ala Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Phe Ala Leu Lys Gly
20 25 30

Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Lys Ala Val Phe
50 55 60

Val Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu
65 70 75 80

Ala Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln
85 90 95

Leu Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Phe Thr Arg Leu
100 105 110

Glu Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Thr Leu Ala Lys
115 120 125

Asn Pro Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Arg
130 135 140

Asp Leu Asp Gln Leu Val Ser Asp Arg Val Ala Val Leu His Pro Glu
145 150 155 160

10

ES 2 742 800 T3

Gly His Leu Ile Thr Pro Glu Trp Leu Trp Gln Lys Tyr Gly Leu Lys
 165 170 175

Pro Glu Gln Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Val Gly Asp Pro Ser Asp
 180 185 190

Asn Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Lys Leu
 195 200 205

Leu Lys Glu Trp Gly Ser Leu Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg
 210 215 220

Val Lys Pro Glu Asn Val Arg Glu Lys Ile Lys Ala His Leu Glu Asp
 225 230 235 240

Leu Arg Leu Ser Leu Glu Leu Ser Arg Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu
 245 250 255

Glu Val Asp Leu Ala Gln Gly Arg Glu Pro Asp Arg Glu Gly Leu Arg
 260 265 270

Ala Phe Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
 275 280 285

Leu Leu Glu Ala Pro Ala Pro Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro
 290 295 300

Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Pro Glu Pro Met Trp
 305 310 315 320

Ala Glu Leu Lys Ala Leu Ala Ala Cys Arg Asp Gly Arg Val His Arg
 325 330 335

Ala Ala Asp Pro Leu Ala Gly Leu Lys Asp Leu Lys Glu Val Arg Gly
 340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Ser Arg Glu Gly Leu Asp
 355 360 365

Leu Val Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro
 370 375 380

Ser Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp
 385 390 395 400

Thr Glu Asp Ala Ala His Arg Ala Leu Leu Ser Glu Arg Leu His Arg
 405 410 415

Asn Leu Leu Lys Arg Leu Gln Gly Glu Glu Lys Leu Leu Trp Leu Tyr
 420 425 430

ES 2 742 800 T3

His Glu Val Glu Lys Pro Leu Ser Arg Val Leu Ala His Met Glu Ala
 435 440 445
 Thr Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Gln Ala Leu Ser Leu Glu
 450 455 460
 Leu Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Glu Glu Val Phe Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Gly His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu
 485 490 495
 Phe Asp Glu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Gly Lys Thr Gln Lys Thr Gly
 500 505 510
 Lys Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His
 515 520 525
 Pro Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln His Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys
 530 535 540
 Asn Thr Tyr Val Asp Pro Leu Pro Ser Leu Val His Pro Asn Thr Gly
 545 550 555 560
 Arg Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu
 565 570 575
 Ser Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu
 580 585 590
 Gly Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Val Ala Glu Ala Gly Trp Ala Leu
 595 600 605
 Val Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu
 610 615 620
 Ser Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Lys Asp Ile
 625 630 635 640
 His Thr Gln Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Pro Glu Ala Val
 645 650 655
 Asp Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Val Asn Phe Gly Val Leu
 660 665 670
 Tyr Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr
 675 680 685
 Glu Glu Ala Val Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys
 690 695 700

ES 2 742 800 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly

<210> 27

<211> 833

5 <212> PRT

<213> *Thermus filiformis*

<400> 27

Met Thr Pro Leu Phe Asp Leu Glu Glu Pro Pro Lys Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe Tyr Ala Leu Ser Leu
20 25 30

Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Met Val Tyr Gly Phe Ala Arg
35 40 45

Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Gln Ala Val Val Val Val
50 55 60

Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Glu Ala Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu Ala
85 90 95

10 Leu Val Lys Arg Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Val Arg Leu Glu Ala

ES 2 742 800 T3

100 105 110
 Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Gly Thr Leu Ala Lys Lys Ala
 115 120 125
 Glu Arg Glu Gly Met Glu Val Arg Ile Leu Thr Gly Asp Arg Asp Phe
 130 135 140
 Phe Gln Leu Leu Ser Glu Lys Val Ser Val Leu Leu Pro Asp Gly Thr
 145 150 155 160
 Leu Val Thr Pro Lys Asp Val Gln Glu Lys Tyr Gly Val Pro Pro Glu
 165 170 175
 Arg Trp Val Asp Phe Arg Ala Leu Thr Gly Asp Arg Ser Asp Asn Ile
 180 185 190
 Pro Gly Val Ala Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Leu Arg Leu Leu Ala
 195 200 205
 Glu Trp Gly Ser Val Glu Asn Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Val Lys
 210 215 220
 Pro Asp Ser Val Arg Arg Lys Ile Glu Ala His Leu Glu Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Leu Asp Leu Ala Arg Ile Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Asp Phe Lys Ala Leu Arg Arg Arg Thr Pro Asp Leu Glu Gly Leu Arg
 260 265 270
 Ala Phe Leu Glu Glu Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly
 275 280 285
 Leu Leu Gly Gly Glu Lys Pro Arg Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro
 290 295 300
 Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Leu Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp
 305 310 315 320
 Ala Glu Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Glu Gly Arg Val His Arg
 325 330 335
 Ala Thr Ser Pro Val Glu Ala Leu Ala Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly
 340 345 350
 Phe Leu Ala Lys Asp Leu Ala Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Val Ala
 355 360 365
 Leu Asp Pro Thr Asp Asp Pro Leu Leu Val Ala Tyr Leu Leu Asp Pro

ES 2 742 800 T3

645 650 655

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Glu Asp Arg Ala Glu Glu Ala Lys
785 790 795 800

Ala Leu Val Lys Glu Val Met Glu Asn Thr Tyr Pro Leu Asp Val Pro
805 810 815

Leu Glu Val Glu Val Gly Val Gly Arg Asp Trp Leu Glu Ala Lys Gly
820 825 830

Asp

- 5 <210> 28
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador

- <400> 28
- cctgctctgc cgcttcacgc 20

- 15 <210> 29
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador

- <400> 29
- cgaacgtcgc gcagagaaac agg 23

- 25 <210> 30
- <211> 23
- <212> ADN

ES 2 742 800 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

5 <400> 30
gcctcgttgc gtttgtttgc acg 23

10 <210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 31
gcacagaagc tattatgcgt ccccagg 27

20 <210> 32
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 32
ccatgattca gtgtgcccggt ctgg 24

30

REIVINDICACIONES

1. Una ADN polimerasa Taq modificada que cataliza la polimerización de desoxinucleótidos y:
 - 5 (a) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la de la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1;
 - (b) comprende una alteración de aminoácidos en la posición E507 con respecto a SEQ ID NO:1, cuya alteración es una sustitución, en la que la sustitución es E507K; y
 - 10 (c) tiene: (i) actividad de polimerización y procesividad incrementadas; y (ii) tolerancia incrementada a las sales y/o los tintes intercalantes de ácido nucleico con respecto a la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1.
- 15 2. La polimerasa de la reivindicación 1, que tiene una tolerancia a sales incrementada con respecto a la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1.
3. La polimerasa de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una procesividad incrementada con respecto a la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1, medida por la unión a heparina.
- 20 4. La polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 96 % idéntica a la de la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1.
5. La polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 97 % idéntica a la de la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1.
- 25 6. La polimerasa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % idéntica a la de la ADN polimerasa Taq natural de SEQ ID NO:1.
7. Una ADN polimerasa Taq modificada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.
- 30 8. Un kit que comprende una polimerasa modificada de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
9. Una secuencia de nucleótidos que codifica una polimerasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 10. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 9.
11. Una célula que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 9 o el vector de la reivindicación 10.
- 40 12. Un procedimiento de síntesis de polinucleótidos que usa una ADN polimerasa Taq modificada, en el que la ADN polimerasa Taq modificada es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el procedimiento comprende: marcaje de ADN por desplazamiento de mella, síntesis de ADNc bicatenario en clonación de ADNc, secuenciación de ADN, amplificación de genoma completo y amplificación, detección y/o clonación de secuencias de ácido nucleico usando la reacción en cadena de la polimerasa.
- 50 14. Un procedimiento que comprende amplificar un fragmento de ADN usando una ADN polimerasa Taq modificada, en el que la ADN polimerasa Taq modificada es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

ES 2 742 800 T3

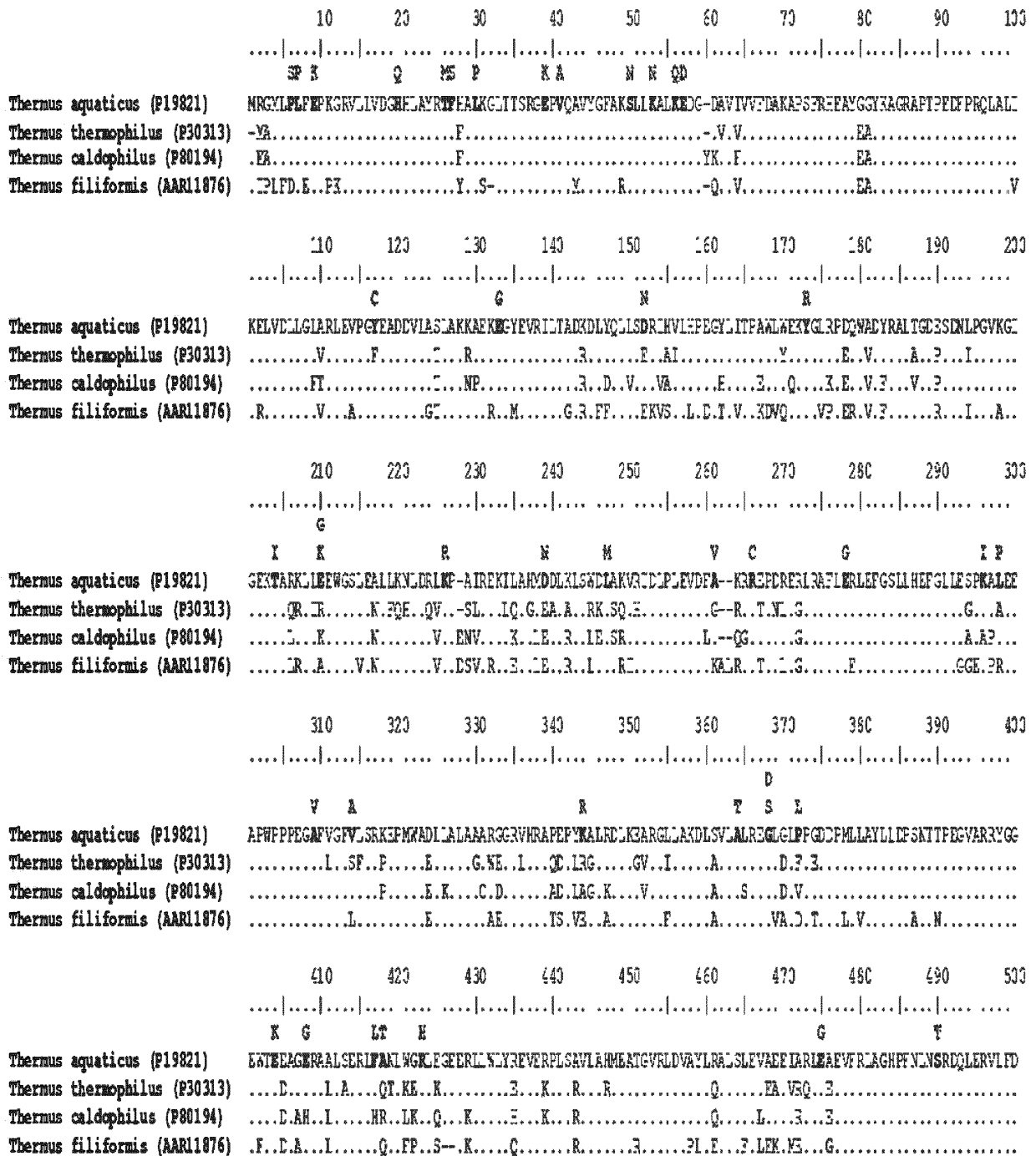
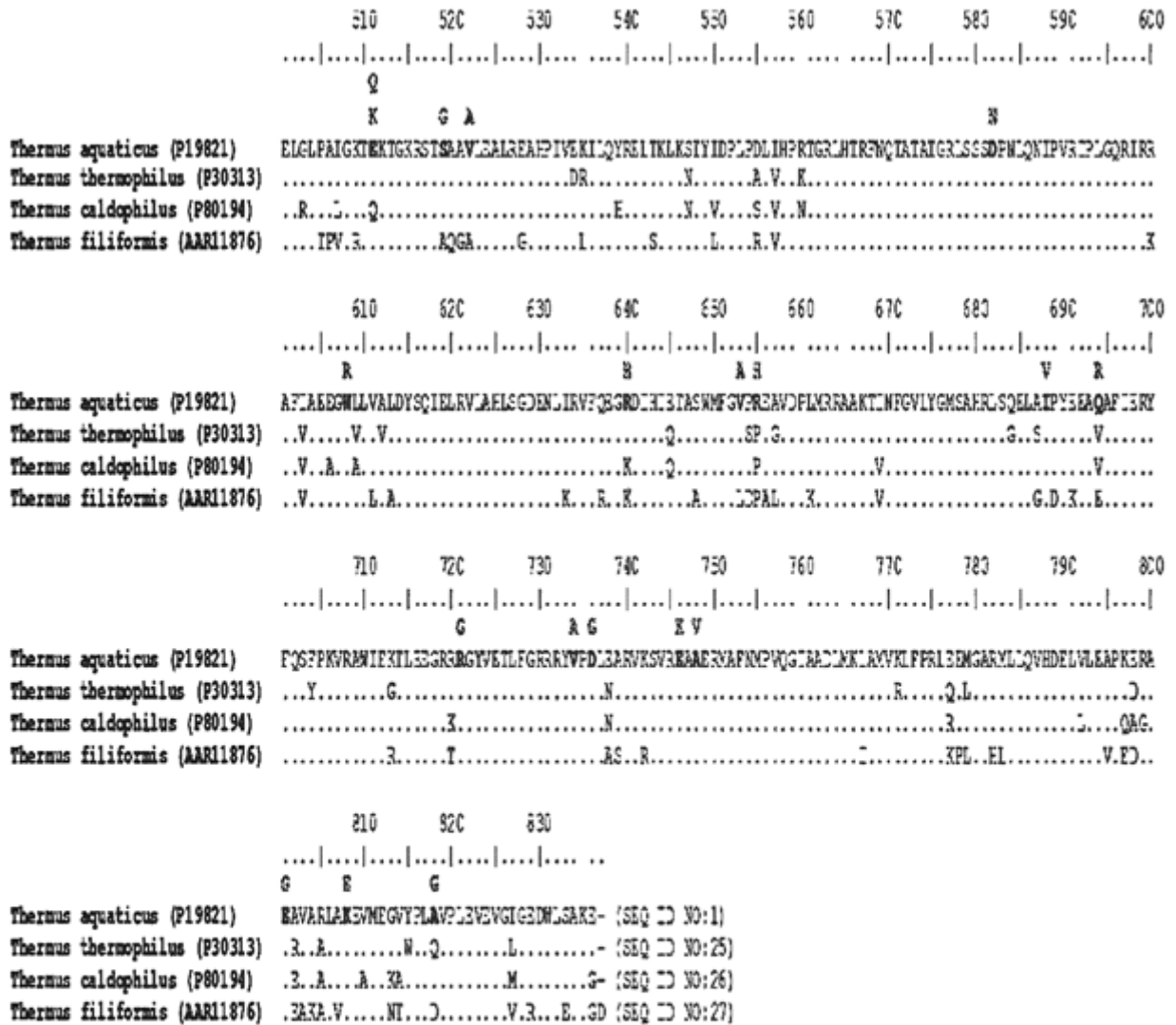


FIG. 1



CONTINUACIÓN DE LA FIG. 1