



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 173**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00988824 .9**
96 Fecha de presentación : **21.12.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1242586**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54 Título: **ARN polimerasas del bacteriófago $\phi 6$ - $\phi 14$ y utilización de las mismas.**

30 Prioridad: **21.12.1999 FI 19992751**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2011

73 Titular/es: **RNA-LINE Oy**
Ylänkötie 20
FIN-04430 Järvenpää, FI

72 Inventor/es: **Makeyev, Eugeny y**
Bamford, Dennis

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 352 173 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

SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una proteína polimerasa nueva capaz de sintetizar ARN en presencia de diferentes plantillas de ARN y ADN. La presente invención también se refiere a un método y un kit para la síntesis de ARN mediante el contacto de dicha proteína polimerasa con diferentes plantillas de ARN y ADN bajo las condiciones apropiadas. La presente invención también se refiere a métodos para estabilizar y secuenciar ácidos nucleicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus con ARN de doble cadena son conocidos por infectar diferentes huéspedes desde procariontes a eucariotes superiores. Algunos de estos virus provocan enfermedades infecciosas graves que afectan a los seres humanos y a animales y plantas importantes económicamente (Fields y Knipe, 1990). A pesar de las notables variaciones en la organización estructural y la especificidad del huésped, prácticamente todos los virus de ARN de doble cadena comparten una estrategia de replicación común. Después de la entrada, el virión se convierte en la mayoría de los casos en una partícula central que actúa como transcriptasa produciendo ARN de cadena simple en sentido positivo utilizando los ARN de doble cadena genómicos como plantillas. Los ARN de cadena simple formados en el núcleo viral se expulsan al citoplasma donde actúan como los mensajeros que dirigen la síntesis de proteínas. Los mismos ARN de cadena simple también son completamente activos como plantillas para la síntesis de cadenas "menos" complementarias (replicación). Este proceso tiene lugar en el interior de partículas del núcleo recién ensambladas y está dirigido por la polimerasa viral. Después de la replicación, la réplica del ARN de cadena "menos" permanece asociada con la plantilla de cadena "más" reconstituyendo el ARN de doble cadena genómico. Las partículas del núcleo que transportan el ARN de doble cadena pueden soportar rondas adicionales de transcripción o, de forma alternativa, someterse a una maduración posterior para formar partículas de la progenie infecciosa. Tanto la replicación como la transcripción de los virus de ARN de doble cadena dependen, de este modo, de las actividades de polimerasa codificadas por el virus y tienen lugar en el interior de un complejo proteico grande. Entre las diversas proteínas que conforman el complejo de polimerasa de cualquiera de los virus de ARN de doble cadena, sólo se ha predicho teóricamente que una

especie de polipéptido contiene varios motivos conservados de la secuencia característica a lo largo de las ARN polimerasas (Koonin y otros, 1989; Bruenn, 1991; Bruenn 1993). Sin embargo, hasta ahora no se dispone de pruebas bioquímicas directas de la actividad polimerasa de dichas proteínas.

Hasta ahora se han desarrollado varios sistemas experimentales para arrojar luz sobre los principios moleculares que gobiernan el metabolismo de ARN en los complejos de polimerasa de virus de ARN de doble cadena. El primero de estos sistemas era una transcripción *in vitro* basada en virus intactos purificados o partículas de núcleo derivadas de preparaciones de virus y, de este modo, ya contienen plantillas de ARN de doble cadena. Dichos sistemas se han descrito para reovirus (Joklik, 1974), bacteriófago $\phi 6$ (Van Etten y otros, 1973; Partridge y otros, 1979), virus de necrosis pancreática infecciosa (Cohen, 1975), partículas del tipo del virus de la levadura (Herring y Bevan, 1977) y muchos otros. Estas estrategias han proporcionado una información detallada sobre los mecanismos y la regulación de la síntesis de ARN de cadena simple. Sin embargo, la transcripción basada en partículas no permitía dirigir cuestiones sobre la replicación.

Esto se enfocó utilizando intermedios aislados de virus que contenían ARN de cadena simple empaquetados (véase, por ejemplo, Fujimura y otros, 1986) y partículas vacías de polimerasa. En el caso del fago $\phi 6$, se encontró que las partículas vacías del complejo de polimerasas (PC) recombinantes eran activas en el empaquetado, replicación y transcripción *in vitro* de ARN (Gottlieb y otros, 1990; Olkkonen y otros, 1990; Van Dijk y otros, 1995). Se demostró que otros dos sistemas, las partículas del tipo del virus de la levadura (VLPs) y las partículas de núcleo abierto de rotavirus ayudaban en la replicación de plantillas de ARN de cadena simple exógeno específico del virus (Fujimura y Wickner, 1988; Chen y otros, 1994).

El bacteriófago $\phi 6$ es un virus de ARN de doble cadena complejo de *Pseudomonas syringae* (Vidaver y otros, 1973). El genoma de $\phi 6$ comprende tres segmentos de ARN de doble cadena: grande (L), medio (M) y pequeño (S) (Semancik y otros, 1973; Van Etten y otros, 1974). Para los objetivos de la presente invención, se hará referencia a las cadenas en sentido positivo de los segmentos de ARN de $\phi 6$ como l^+ , m^+ , s^+ ; y las cadenas en sentido negativo se designarán, correspondientemente, como l^- , m^- , s^- . El complejo de

polimerasas completo del fago $\phi 6$ está compuesto de cuatro tipos de proteínas P1, P2, P4 y P7, todos codificados en el segmento L (Mindich y otros, 1988). P1 es la proteína estructural principal ensamblada a una cubierta dodecaédrica, estando el resto de las subunidades de proteína localizadas en las posiciones de simetría del pliegue en 5 (Butcher y otros, 1997; de Haas y otros, 1999). Los estudios sobre proteínas recombinantes individuales y partículas de PC incompletas modificadas genéticamente han permitido entender las funciones de P4 y P5. P4 es una NTPasa hexamérica responsable del empaquetamiento de ARN de cadena positiva (Gottlieb y otros, 1992a; Paatero y otros, 1995; Frilander y Bamford, 1995; Juuti y otros, 1998; Paatero y otros, 1998), mientras que P7 actúa como cofactor de proteína necesario para la reacción de empaquetamiento eficaz (Juuti y Bamford, 1995, 1997). P2, hasta ahora la proteína PC menos estudiada, se ha identificado como una supuesta subunidad de polimerasa utilizando el análisis informático de la secuencia de la proteína (Koonin y otros, 1989; Bruenn, 1991). Esta conclusión estaba respaldada además por los estudios bioquímicos sobre diferentes partículas de PC deficientes en proteína (Gottlieb y otros, 1990; Casini y otros, 1994; Juuti y Bamford, 1995).

¿Puede la supuesta polimerasa de un virus de ARN de doble cadena catalizar sola la síntesis de ARN dependiente de plantilla o la actividad de síntesis está estrictamente asociada con la proteína polimerasa unida a la partícula? Hasta hace poco, esta cuestión permanecía sin respuesta. Hasta ahora, ni la proteína P2 del fago $\phi 6$ ni las supuestas polimerasas análogas de otros virus con ARN de doble cadena (excepto la polimerasa de rotavirus) se han obtenido de forma aislada. Esto puede ser debido al hecho de que la supuesta polimerasa representa sólo un componente menor del complejo de polimerasas, disuadiendo de este modo cualquier intento de purificar la proteína directamente a partir de este complejo. Además, no se conoce ningún sistema de expresión génica que permita la producción de proteína polimerasa individual soluble. Para dos supuestas polimerasas, la del virus de la lengua azul y la del virus de la enfermedad bursal infecciosa, se ha descrito que cierta actividad polimerasa está asociada con los extractos crudos de las células que producen las proteínas recombinantes correspondientes (Urakawa y otros, 1989; Macreadie y Azad, 1993). Sin embargo, estos documentos no han dado a conocer ninguna prueba de la asociación

directa de las actividades polimerasa observadas con las proteínas de interés. Por otro lado, se ha observado que la supuesta polimerasa de rotavirus VP1 posee ciertas actividades parciales relevantes. Se encontró que la enzima se unía a un análogo de nucleótido (Valenzuela y otros, 1991) y el ARN de cadena simple viral (Patton, 1996). Sin embargo, la proteína aislada, no conseguía replicar sustratos de ARN a menos que estuviera complementada, como mínimo, con una proteína adicional VP2 (proteína estructural principal) (Zeng y otros, 1996; Patton y otros, 1997).

En la presente invención, se muestra una polimerasa que es capaz de sintetizar ARN *in vitro* sin ayuda de ninguna otra proteína. Tal como será evidente a partir de la siguiente descripción, la polimerasa de la presente invención es relativamente inespecífica a la plantilla que se utiliza para la polimerización del ARN. En cambio, la especificidad de plantilla de las polimerasas dependientes de ARN de la técnica anterior era, en general, bastante estricta. Por ejemplo, la ARN polimerasa del bacteriófago Q β replica de manera eficaz un grupo muy limitado de plantillas a menos que el cebador del ARN se hibride al ARN diana (patente de Estados Unidos No. 5631129 y las referencias en la misma). Una estructura específica del tipo ARNt terminal en 3' es esencial para la replicación del ARN con la polimerasa de ARN del virus del mosaico del bromo (Dreher y Hall, 1988). De manera análoga, son necesarios elementos específicos del virus para la síntesis del ARN catalizada por la polimerasa del virus de la gripe (patente de Estados Unidos No. 5854037). Finalmente, se ha observado que las partículas de núcleo abierto del rotavirus sólo replican los ARN de cadena simple homólogos (Chen y otros, 1994; y la patente de Estados Unidos No. 5614403).

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a una proteína polimerasa inespecífica nueva capaz de sintetizar ARN independiente de cebador en presencia de un conjunto de plantillas de ARN y ADN. Los presentes inventores creen que ésta es la primera vez que se da a conocer el aislamiento de una ARN polimerasa que es capaz de replicar *in vitro* de manera eficaz e independiente de cebador una amplia gama de plantillas de ARN de cadena simple tanto específicas de virus como heterólogas, para producir los productos de ARN de doble cadena correspondientes. En una realización preferente, la

polimerasa se origina a partir de un virus de ARN de doble cadena o a partir de una célula que contiene un ácido nucleico que codifica la polimerasa de un virus de ARN de doble cadena. Las características de la polimerasa de la presente invención la hacen particularmente adecuada para (1) la amplificación *in vitro* de ARN, (2) la incorporación de análogos de nucleótidos fácilmente detectables en un producto de síntesis, (3) la síntesis de ARN para producir ARN de cadena simple muy largos, (4) la estabilización de ácidos nucleicos de cadena simple, y (5) la secuenciación de polinucleótidos.

La proteína polimerasa de la presente invención se origina preferentemente a partir de los virus *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae* o *Totiviridae*, específicamente a partir de bacteriófagos relacionados con $\phi 6$ de la familia de *Cystoviridae*, tales como de $\phi 6$, $\phi 7$, $\phi 8$, $\phi 9$, $\phi 10$, $\phi 11$, $\phi 12$, $\phi 13$, o $\phi 14$ (Mindich y otros, 1999).

La realización más preferente de esta técnica se refiere a la polimerasa P2 del bacteriófago $\phi 6$ con ARN de doble cadena. De manera más específica, la polimerasa P2 se aisló de una cepa bacteriana que contenía ADN que codificaba dicha proteína. En un análisis enzimático *in vitro* se demostró que la preparación de la polimerasa P2 aislada actuaba como una ARN polimerasa dependiente de plantilla. Se encontró que la polimerasa P2 presenta una especificidad baja por la plantilla siendo capaz de sintetizar ARN en presencia de los sustratos de ARN de cadena simple, ARN de doble cadena, ADN de cadena simple y ADN de doble cadena, preferentemente en forma lineal. La polimerasa P2 es procesiva, presenta una velocidad de polimerización del ARN muy elevada y no requiere cebador para el inicio de la síntesis de ARN, aunque también es capaz de iniciar la síntesis de ARN en presencia de un cebador. La presente invención también se refiere a formas modificadas genéticamente de una polimerasa P2 u otras formas alteradas que son modificadas debido a los cambios naturales en el código genético.

Según el conocimiento de los presentes inventores, esta es la primera vez que se da a conocer el aislamiento de una ARN polimerasa capaz de replicar *in vitro* de manera eficaz e independiente de cebador una amplia gama de plantillas de ARN de cadena simple, tanto específicas de virus como heterólogas, para producir los productos de ARN de doble cadena correspondientes. La

especificidad de plantilla de otras ARN polimerasas conocidas dependientes de ARN es, en general, bastante estricta, tal como se ha descrito anteriormente en la presente invención. La polimerasa de la presente invención representa un nuevo tipo de enzima, la cual se puede utilizar en biología molecular como una herramienta general para producir ARN de doble cadena a partir de prácticamente cualquier plantilla determinada de ARN de cadena simple. Recientemente, el ARN de doble cadena ha sido objeto de un considerable interés ya que se ha observado que desencadena un conjunto de procesos muy importantes en diferentes organismos (para una revisión, véase Sharp, 1999).

La capacidad de la polimerasa de la presente invención de utilizar diferentes plantillas de ARN de doble cadena para la síntesis *in vitro* de ARN es también una característica nueva que no se conoce para ninguna de las polimerasas estudiadas. Aunque previamente se han dado conocer partículas del tipo del virus de la levadura para catalizar la síntesis de ARN dependiente de ARN de doble cadena, la única plantilla utilizada para la transcripción de ARN en este sistema fue un ARN de doble cadena específico del virus (Fujimura y Wickner, 1989). En la presente invención, el término "transcripción de ARN" se refiere a la síntesis de ARN sobre plantillas de ARN de doble cadena. En la transcripción de ARN catalizada por la polimerasa P2, el ARN recién sintetizado forma dobles cadenas con la cadena de plantilla de la plantilla del ARN de doble cadena y desplaza la cadena que no es de la plantilla antigua. Este tipo de reacción se puede utilizar de este modo para marcar un sustrato de ARN de doble cadena con nucleótidos radioactivos o modificados químicamente incorporados en el producto de ARN de doble cadena resultante durante la incubación con la polimerasa. De forma alternativa, la reacción se puede utilizar para recuperar el ARN de cadena simple desplazado del sustrato de ARN de doble cadena.

La capacidad de la proteína polimerasa de la presente invención para convertir el ARN de cadena simple en ARN de doble cadena y para transcribir el ARN de doble cadena mediante el mecanismo de desplazamiento de cadena sugiere la utilización de las enzimas para amplificar *in vitro* el ARN. A diferencia de las polimerasas convencionales, la proteína P2 no requiere un cebador para sintetizar un producto complementario de una plantilla de ARN de cadena simple. Por consiguiente, la polimerasa P2 es

particularmente adecuada para amplificar sustratos de ARN. Estas características hacen que la polimerasa de la presente invención sea particularmente útil en el contexto de la detección de infecciones. Un método de diagnóstico en este aspecto comprende amplificar la muestra de ARN y, opcionalmente, incorporar fácilmente análogos de nucleótidos detectables en el producto de amplificación, así como identificar las muestras de ARN mediante secuenciación directa.

También es altamente ventajoso que la polimerasa de la presente invención sea capaz de sintetizar ARN en presencia de sustratos de ADN. Esta característica permite la producción de heterocadenas dobles de ADN-ARN deseadas adecuadas para estudios tanto biológicos como físico-químicos. También permite la síntesis de ARN a partir de plantillas de ADN en presencia de nucleótidos marcados radioactivamente o modificados químicamente para producir heterocadenas dobles de ADN-ARN marcadas radioactivamente o que contienen nucleótidos modificados químicamente, respectivamente.

La presente invención contempla un método para la síntesis *in vitro* de ARN que utiliza polimerasas de la presente invención. El método comprende: (a) proporcionar un sustrato de ácido nucleico que puede pertenecer a ARN de cadena simple, o ARN de doble cadena, o ADN de cadena simple, o ADN de doble cadena, tal como se especificará a continuación en la descripción detallada; (b) poner en contacto dicho sustrato con una proteína polimerasa bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN; y (c) recuperar de la mezcla de reacción los ácidos nucleicos recién formados. Este método para la preparación de ARN de doble cadena se puede utilizar de manera ventajosa para producir ARN de doble cadena muy larga, como mínimo, hasta 13.500 pb, a diferencia de los métodos que dependen de la hibridación ARN-ARN. Las técnicas existentes descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5795715 producen habitualmente ARN de doble cadena de menos de 1000 pb de longitud.

La proteína polimerasa de la presente invención se puede utilizar en métodos para estabilizar ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de cadena simple son conocidos por ser fácilmente degradables por las nucleasas. Mediante la conversión de ácidos nucleicos de cadena simple en ácidos nucleicos de doble cadena y el contacto de la mezcla de reacción con una preparación que contiene una nucleasa o nucleasas, es posible recuperar los ácidos nucleicos

de doble cadena que tienen una mayor estabilidad en comparación con los ácidos nucleicos de cadena simple.

La presente invención también da a conocer un kit para la síntesis *in vitro* de ARN dependiente de plantilla, tal como se describe a continuación.

La presente invención también se refiere a un método para producir ARN de doble cadena a partir de ADN de doble cadena. El método comprende:

- (a) proporcionar un sustrato de ARN de cadena simple mediante la transcripción de una plantilla de ADN con una ARN polimerasa dependiente de ADN; y
- (b) convertir el sustrato de ARN de cadena simple en ARN de doble cadena con la proteína de la presente invención, donde las etapas (a) y (b) se llevan a cabo preferentemente de manera simultánea o secuencial en el mismo recipiente de reacción.

La presente invención también se refiere a métodos para la determinación de la secuencia de bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico utilizando la proteína polimerasa de la presente invención. Esto abre la posibilidad de dirigir la secuenciación de ácidos nucleicos sin cebador. También se da a conocer un kit específico para secuenciar moléculas de ácido nucleico.

Otras características, aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones que se acompañan.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

El texto anterior, así como la siguiente descripción detallada de la presente invención, se entenderán mejor cuando se lean conjuntamente con las figuras que se acompañan, en las que:

la figura 1 muestra la purificación de la P2 recombinante producida en células de *E. coli*. La expresión de P2 se realizó a 15°C durante 18 h, tal como se describe en el ejemplo 1. (A) Gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie G-250. Carriles: composición proteica de las células bacterianas BL21 (DE3/pEM2) antes (1) y después (2) de la inducción de la síntesis de P2 con IPTG; lisado celular aclarado (3); muestras después de la purificación sucesiva sobre agarosa Azul de Cibacrón (4), heparina-agarosa (5), y la columna Resource Q (6). Las proteínas del $\phi 6$ de tipo

salvaje están marcadas a la derecha. (B) Análisis por inmunotransferencia de las mismas muestras proteicas utilizando anticuerpos desarrollados contra el complejo de polimerasas completo de $\phi 6$ (proteínas P1, P2, P4, y P7).

La designación del carril es como en (A).

La figura 2 representa la síntesis *in vitro* de ARN catalizada por P2 recombinante en presencia de una plantilla de ARN de cadena simple. Análisis en gel de agarosa de alícuotas de 10 μ l de las mezclas de análisis estándar de polimerasa que contienen (excepto el carril 8) el segmento m del sentido positivo de la cadena simple sintética del fago $\phi 6$ (m^+ ARN; 100 μ g/ml). Los aditivos críticos se indican debajo de los paneles. P2 se refiere a la proteína P2 purificada (carril 6 en la figura 1). P2-CBA es P2 parcialmente purificada después de la columna con agarosa Azul de Cibacrón (figura 1, carril 4) y "mock"-CBA es la fracción de proteína preparada de forma análoga derivada de células BL21(DE3) inducidas por IPTG que contienen el plásmido pET32b(+). La posición de los segmentos de $\phi 6$ marcados producidos en la transcripción de la nucleocápside (N) se muestra a la izquierda. Los segmentos de doble cadena están marcados con letras mayúsculas (L, M y S), y los segmentos de cadena simple de sentido positivo se muestran en minúscula (l^+ , m^+ y s^+). (A) Gel teñido con EtBr; (B) autorradiograma del mismo gel.

La figura 3 representa que el producto de la síntesis de ARN es ARN de doble cadena formado por la plantilla y la cadena complementaria recién producida. Productos del análisis de replicación de ARN m^+ analizados en un gel de separación de cadenas. Los carriles marcados con p contenían proteína P2 en el análisis (mismas condiciones que en el carril 4 de la figura 2); los marcados con b estaban complementados con una cantidad igual del tampón de control de P2 (igual que en el carril 2 de la figura 2). Los carriles marcados con N contienen segmentos de $\phi 6$ marcados producidos en la transcripción de la nucleocápside. Los segmentos de ARN de doble cadena se desnaturalizaron por calor (se hirvieron) para producir ARN individuales positivos (l^+ , m^+ y s^+) y negativos (l^- , m^- y s^-). No apareció separación de cadenas si se omitía la etapa de ebullición (no se hervía). El panel (A)

es gel teñido con EtBr; (B) es el autorradiograma del mismo gel. (C) Análisis de protección de ARNasa. Los productos de reacción purificados a partir de las mezclas de replicación con P2 (p) o el control (b) que contenían la plantilla de ARN m⁺ marcada con [α^{32} P]UMP y nucleótido trifosfatos no marcados se incubaron con (+ARNasa) o sin la adición (-ARNasa) de ARNasa I y se analizaron en el gel de agarosa estándar.

La figura 4 representa que la actividad replicasa está asociada con el monómero de P2. La P2 purificada se analizó en la columna de filtración con gel Superdex 75 y la actividad replicasa se determinó en las fracciones recogidas. El máximo de la actividad replicasa coincide con el máximo de proteína P2. (A) Perfil de absorbancia (280 nm) del eluato de la columna. (B) Las flechas indican el tiempo de inyección de P2 (inyectar) y la posición de los patrones de masa molecular: BD, Azul de dextrano (2000 kDa); β Am, β -amilasa (200 kDa); IgG, inmunoglobulina G de ratón (150 kDa); BSA, albúmina de suero bovino (67 kDa); OA, ovoalbúmina (45 kDa); STI, inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa); α LA, α -lactoalbúmina (14,2 kDa). En la inserción, el análisis por SDS-PAGE del contenido de proteína en las fracciones 9 a 22. (B) Autorradiograma del gel de agarosa que muestra la actividad replicasa en las fracciones 1 a 29. El carril N es tal como se define en la figura 2.

La figura 5 representa que P2 replica de manera no específica sustratos de ARN de cadena simple. (A) Gel teñido con EtBr que muestra los productos de replicación de las reacciones que contenían la proteína P2 (p) purificada o el tampón de control (b).

Los sustratos de ARN de cadena simple utilizados para programar las reacciones fueron los siguientes. 1, ARN 1⁺ (segmento grande sintético de sentido positivo del fago ϕ 6 producido con la transcripción con T7 de pLM687 tratado con XbaI y nucleasa de habas de mung, MBN); 2, ARN m⁺ (segmento medio, igual que en la figura 2); 3, ARN s⁺ (segmento pequeño; transcrito T7 de pLM659 tratado con XbaI y MBN); 4, ARN s⁺ acortado (transcrito T7 de pLM659 cortado con Eco471111); 5, ARN s⁺ extendido (transcrito T7 de pLM659 cortado con SmaI); 6, ARN s⁺ extendido (transcrito T7 de pLM659 cortado con EcoRI); 7, ARN de 13,5 kb de largo que

contiene los segmentos s^+ , m^+ y 1^+ fusionados (transcrito T7 de pLM1809 tratado con XbaI y MBN); 8, mezcla de segmentos naturales s^+ , m^+ y 1^+ purificados a partir de la transcripción dirigida por la nucleocápside de $\phi 6$; 9, mezcla de ARN producida por la transcripción con T7 del ADN completo del bacteriófago T7; 10, ARNm de luciferasa de luciérnaga (transcrito SP6 de pGEMluc cortado con StuI); 11, ARN genómico del colifago MS2 (Boehringer); 12, mezcla de segmentos de ARN de cadena simple de la cepa 1 del virus de la lengua azul (BTV1) precipitados con LiCl a partir de la transcripción de la nucleocápside de BTV1. Los segmentos de $\phi 6$ de la transcripción de la nucleocápside (N) están marcados a la izquierda. Las posiciones de los diez segmentos de ARN genómico de doble cadena extraídos con fenol a partir de los viriones de BTV1 se muestran a la derecha (B1-B10). (B) Autorradiograma del mismo gel.

La figura 6 representa la evolución en el tiempo de la replicación dirigida por P2. (A) La mezcla de replicación de 100 μ l programada con los tres segmentos naturales de sentido positivo se incubó a 28°C en presencia de la proteína P2. Se analizaron alícuotas de 5 μ l, recogidas en los puntos de tiempo indicados, en el gel de agarosa estándar y realizó una autorradiografía. El carril N es como en la figura 2. (B, C y D) Análisis por fosfoimagen (Fuji BAS 1500) de la acumulación dependiente del tiempo de los productos de replicación L, M y S, respectivamente. Los gráficos se normalizan, de manera que el valor observado más elevado en cada panel se fija a 100%. Las inserciones en B, C y D muestran los primeros 300 s de la evolución con el tiempo. Las líneas extrapolan las partes lineales de las representaciones al eje del tiempo. τ_L , τ_M y τ_S indican la duración de las fases de retraso antes de la aparición de los segmentos de ARN de doble cadena de longitud completa relevantes.

La figura 7 representa que P2 inicia la replicación a partir del nucleótido terminal en 3' de la plantilla de ARN de cadena simple. Los productos de ARN de las reacciones de replicación programadas con la mezcla de segmentos de ARN de cadena simple natural s^+ , m^+ y 1^+ que contienen la proteína P2 (p) o el tampón (b) se analizaron en el experimento de extensión con cebador con un cebador marcado complementario a

la cadena negativa (s) del segmento pequeño de $\phi 6$. Como control, también se realizó la extensión con cebador en el genoma con ARN de doble cadena desnaturalizado con calor (d) extraído de $\phi 6$ de tipo salvaje. Los carriles de secuenciación con terminación con didesoxinucleótido (A, C, G y T) están encuadrados. Se produjeron con el mismo cebador y T7 Sequenase 2.0 (Amersham) utilizando el plásmido pLM659 que contenía el ADNc clonado del segmento s⁺. La lectura de la secuencia se muestra a la izquierda. El T terminal en 3' de s⁺ está marcado con la flecha y los sitios únicos de restricción mencionados en la figura 5 están subrayados.

La figura 8 representa que la polimerasa P2 cataliza la síntesis de ARN (transcripción) en presencia de plantillas de ARN de doble cadena. El gel teñido con EtBr (A) y el autorradiograma del mismo gel (B) muestran productos de las reacciones que contienen la proteína P2 (p) purificada o el tampón de control (b). Los sustratos de ARN de doble cadena fueron los siguientes. $\phi 6$, mezcla de segmentos de ARN genómico de doble cadena extraídos del bacteriófago $\phi 6$; L-A, ARN genómico de doble cadena del virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae*; BTV1, mezcla de segmentos de ARN genómico de doble cadena del virus de lengua azul, cepa 1. Las posiciones de los segmentos L, M y S de $\phi 6$ se muestran a la izquierda, las de los diez segmentos de BTVI (B1-B10) se muestran a la derecha.

La figura 9 representa que la transcripción catalizada por P2 de los sustratos de ARN de doble cadena específicos de $\phi 6$ da lugar a la síntesis de predominantemente cadenas de ARN de sentido positivo. (A) Se incubaron a 28°C en mezclas de reacción separadas que contenían P2 (p) purificada o tampón de control (b) dos ARN de cadena simple y dos ARN de doble cadena. Se extrajeron las alícuotas de las mezclas en el punto de tiempo de 1 h y se analizó en un gel de agarosa estándar. Los ARN de cadena simple fueron los siguientes: $\phi 6_{ss}$, mezcla de segmentos naturales s⁺, m⁺ y 1⁺ purificados a partir de la transcripción dirigida por la nucleocápside de $\phi 6$; m⁺, ARN m⁺. ARN de doble cadena: $\phi 6_{ds}$, mezcla de tres segmentos genómicos extraídos del bacteriófago $\phi 6$; M, segmento M sintético preparado mediante la replicación de ARN

de cadena simple m^+ con P2 y la posterior purificación del ARN de doble cadena recién formado utilizando una electroforesis en gel de agarosa estándar. El carril N es tal como se define en la figura 2. (B) Electroforesis para la separación en cadenas de los productos de reacción preparados en presencia de P2 tal como se describe en (A) y tratamiento con calor antes del análisis en gel.

La figura 10 representa que la polimerasa P2 cataliza la síntesis de ARN en presencia de plantillas de ADN. (A) El ADN de cadena simple de M13mp10 cortado con *HinfI* se incubó con (1) o sin (2) la polimerasa P2 tal como se describe en el ejemplo 3. N es el carril marcador como en la figura 2. (B) Los ADN de doble cadena de pUC18 cortados con diferentes endonucleasas de restricción: 1, *HincII*; 2, *SmaI*; 3, *KpnI*; 4, *PstI*; 5, *SadI*; 6, *BamHI*; 7, *HindIII*; 8, *XbaI*, se incubaron con la polimerasa P2 y se analizaron tal como se describe en el ejemplo 3. El carril 9 es el resultado de la incubación de pUC18 cortado con *XbaI* en la mezcla de reacción sin P2.

La figura 11 demuestra la incorporación de análogos de nucleótidos en el ARN recién producido. Las mezclas de replicación de P2 estándar se complementaron con (A) 25 μM de Alexa Fluor[®] 488-5-UTP; (B) 25 μM de coumarin-5-CTP; o (C) 100 μM de biotin-11-CTP. Para cada uno de estos análogos de nucleótidos, se llevaron a cabo tres reacciones separadas que contenían: (P) polimerasa P2 (40 $\mu\text{g/ml}$) y sin ARN; (R) plantilla de ARN de cadena simple ms^+ (75 $\mu\text{g/ml}$; Makeyev y Bamford (2000) EMBO J., 19, 6275-6284) y sin polimerasa; (PR) tanto polimerasa P2 como la plantilla de ARN de cadena simple. Después de 1 h de incubación a 30°C, las mezclas de reacción se pasaron a través de columnas de filtración en gel, utilizándose las fracciones que atravesaban (que contenían los productos de reacción de ARN) para el análisis posterior. Espectros de emisión de fluorescencia de las fracciones purificadas registradas a las longitudes de onda de excitación fijas: 490 nm (A); 402 nm (B). (C) Análisis de transferencia por puntos con biotina-estreptavidina. De manera breve, las alícuotas de las fracciones que atravesaban el filtro se depositaron sobre membrana de Hybond N + nylon (Amersham) y se tiñeron con conjugado estreptavidina-HRP

(NEN), a lo que siguió la etapa de detección de ECL (kit de Biological Industries, Israel).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Una proteína polimerasa de la presente invención se origina de un virus con ARN de doble cadena o tiene la secuencia de aminoácidos de dicha polimerasa viral. Una polimerasa de la presente invención cataliza la síntesis de ARN utilizando plantillas de ARN de cadena simple, ARN de doble cadena, ADN de cadena simple, o ADN de doble cadena. Un aspecto clave de la presente invención es un método para purificar una polimerasa a partir de un virus con ARN de doble cadena. Una polimerasa preferente de la presente invención, la polimerasa P2, es procesiva, presenta una velocidad de polimerización de ARN muy elevada, y no requiere cebador para el inicio de la síntesis de ARN, aunque también es capaz de iniciar la síntesis de ARN en presencia de un cebador. Tal como se ha indicado anteriormente, la síntesis independiente de cebador es especialmente útil en la amplificación de ARN para cuantificar las muestras de ARN en la muestra y su identificación mediante secuenciación directa. Esta metodología es especialmente útil en la detección de parásitos patogénicos y diferencias en los niveles de expresión génica asociada con enfermedades.

Polimerasas de la presente invención

El tipo nuevo de ARN polimerasas dependientes de plantilla presenta una especificidad de plantilla muy baja y es capaz de catalizar la síntesis de ARN en presencia de diferentes sustratos de ácido nucleico. Se hace referencia a la ARN polimerasa de diversas maneras, como "polimerasa de un virus con ARN de doble cadena", "polimerasa de virus con ARN de doble cadena", "proteína polimerasa" o "polimerasa". La presente invención da a conocer la primera prueba directa de que la polimerasa aislada originaria de un virus con ARN de doble cadena solo es capaz de sintetizar *in vitro* ARN cuando se pone en contacto un sustrato de ARN de cadena simple, ARN de doble cadena, ADN de cadena simple o ADN de doble cadena bajo condiciones adecuadas.

Preferentemente, la ARN polimerasa de la presente invención puede originarse de cualquier virus con ARN de doble cadena (por ejemplo de *Cystoviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae* o *Totiviridae*). Se espera que los bacteriófagos relacionados con $\phi 6$ de la familia de *Cystoviridae* (por ejemplo $\phi 6$, $\phi 7$, $\phi 8$, $\phi 9$, $\phi 10$, $\phi 11$,

φ12, φ13 o φ14) sean el origen más preferente de la polimerasa de la presente invención.

Las polimerasas idénticas o sustancialmente similares se pueden preparar mediante el aislamiento de un ácido nucleico con una secuencia que codifica una proteína idéntica o sustancialmente similar, la expresión de dicha proteína bajo regiones reguladoras adecuadas en un huésped elegido y el aislamiento de la proteína. El ácido nucleico con una secuencia que codifica dicha proteína se aísla preferentemente de virus con ARN de doble cadena o puede ser sintético o parcialmente sintético.

En una realización preferente de la presente invención el sistema *in vitro* para la síntesis de ARN se basa en la proteína recombinante P2 purificada del bacteriófago φ6 con ARN de doble cadena. También se hace referencia a la proteína P2 del bacteriófago φ6 con ARN de doble cadena de diversas maneras en la presente invención, como "ARN polimerasa de P2", "ARN polimerasa P2", "polimerasa P2" "proteína P2" o "P2".

La presente invención se refiere además a proteínas, que son codificadas por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende:

- (a) una secuencia de ácido nucleico que tiene, como mínimo, una secuencia parcial de ácido nucleico de SEC ID NO: 1;
- (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene, como mínimo, una secuencia parcial de aminoácidos de SEC ID NO: 8;
- (c) una secuencia de ácido nucleico que difiere de la secuencia de ácido nucleico de (a) o (b) debido a la degeneración del código genético;
- (d) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida a la secuencia de ácido nucleico de (a), (b) y/o (c); y
- (e) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra, como mínimo, una identidad del 20%, preferentemente, como mínimo, una identidad del 50% con la secuencia contenida en (b).

Una "secuencia parcial de ácido nucleico" significa una secuencia continua de ARN o ADN que carece, como mínimo, de un nucleótido de un extremo o el otro de la SEC ID NO: 1, siendo la secuencia parcial capaz de regular la expresión de una proteína que tiene una actividad biológica similar a la de la proteína P2.

Una "secuencia parcial de aminoácidos" significa una secuencia continua de aminoácidos que carece, como mínimo, de un aminoácido de un extremo o el otro de la SEC ID NO: 8, que tiene una actividad biológica similar a la de la proteína P2. En realizaciones preferentes, la secuencia parcial de aminoácidos carece de 10, 30, ó 50 aminoácidos de los extremos N-terminal y/o C-terminal del polipéptido.

La presente invención se refiere también a secuencias de ácido nucleico que difieren de la SEC ID NO: 1 debido a la degeneración del código genético.

La presente invención se refiere además a secuencias de ácido nucleico que se hibridan a la SEC ID NO: 1 bajo condiciones de hibridación convencional, preferentemente bajo condiciones astringentes, tales como las descritas por Sambrook y otros, 1989. La hibridación a astringencia elevada puede ser entre aproximadamente 65°C y 70°C en una solución de 6X SSC, SDS al 0,5%, 5X de solución de Denhardt y 100 µg de ADN portador no específico. La sonda preferente tiene 100 bases seleccionadas entre bases contiguas de la secuencia de polinucleótidos establecidas en la SEC ID NO: 1. La sonda en exceso se elimina mediante lavado en una solución que tiene una fuerza iónica equivalente inferior a aproximadamente 0,2X a 0,1X SSC. Un lavado de astringencia elevada habitual es dos veces durante 30 minutos a 55°C y tres veces durante 15 minutos a 60°C.

Estas secuencias de ácido nucleico que se hibridan a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden, en principio, derivar de cualquier organismo que posea dichas secuencias de ácido nucleico. Preferentemente, derivan de virus con ARN de doble cadena. Las secuencias de ácido nucleico que se hibridan a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden aislar, por ejemplo, de bibliotecas genómicas de diversos organismos.

Dichas secuencias de ácido nucleico se pueden identificar y aislar mediante la utilización de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o fragmentos de estas secuencias o los complementos inversos de estas moléculas, por ejemplo, mediante hibridación según técnicas estándar (véase Sambrook y otros, 1989).

Como sonda de hibridación se pueden utilizar moléculas de ácido nucleico que tienen exactamente o sustancialmente la misma

secuencia de nucleótidos que la SEC ID NO: 1 o fragmentos de dicha secuencia. Preferentemente, se utiliza la secuencia de nucleótidos completa de SEC ID NO: 1. Los fragmentos utilizados como sondas de hibridación también pueden ser fragmentos sintéticos obtenidos mediante técnicas de síntesis convencionales, la secuencia de los cuales es sustancialmente idéntica a la de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Una vez se han identificado y aislado los genes que se hibridan a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención, es necesario determinar la secuencia y analizar las propiedades de las proteínas codificadas por dicha secuencia.

El término "secuencia de ácido nucleico de hibridación" incluye fragmentos, derivados y variantes alélicas de la SEC ID No: 1 que codifica una proteína idéntica o sustancialmente similar o un fragmento biológicamente activo de la misma. Se entiende que los fragmentos son partes de secuencias de ácido nucleico lo suficientemente largas para codificar la proteína descrita (o proteína sustancialmente similar) o un fragmento biológicamente activo de la misma. El término "derivado" significa en este contexto que las secuencias de nucleótidos de estas moléculas difieren de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente en una o más posiciones y son altamente homólogas a dicha secuencia.

"% de identidad" significa en la presente invención el porcentaje de aminoácidos idénticos que están presentes en las correspondientes posiciones cuando se alinean dos secuencias de aminoácidos para proporcionar la máxima cantidad de nucleótidos o aminoácidos idénticos en las correspondientes posiciones. La presente invención se refiere a proteínas, la secuencia de aminoácidos de las cuales tiene, como mínimo, el 20%, preferentemente, como mínimo, el 50%, más preferentemente, como mínimo, el 80%, incluso más preferentemente, como mínimo, el 85%, aun más preferentemente, como mínimo, el 90%, y lo más preferente, como mínimo, el 95% de identidad a nivel de aminoácido con la secuencia de aminoácidos específica de la SEC ID NO: 8.

Se puede utilizar el diseño de proteínas para construir polimerasas modificadas que posean propiedades mejoradas. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, mutar la secuencia de aminoácidos de la polimerasa P2 o una proteína que sustancialmente tenga propiedades similares a efectos de fabricar dicha polimerasa:

1) menos especificidad de plantilla; 2) más procesiva; o 3) más eficaz en la catálisis de la síntesis de ARN sobre plantillas de ácidos nucleicos de doble cadena, que la enzima disponible actualmente. Dicha modificación puede incluir además optimizar la enzima para la extensión con el cebador, secuenciación o para la amplificación de ácidos nucleicos.

Producción de la proteína polimerasa de la presente invención

La presente invención da a conocer un método de expresión y purificación de la proteína de la presente invención, preferentemente una proteína polimerasa del virus con ARN de doble cadena. El método comprende (a) cultivar una célula que contiene ácido nucleico con una secuencia que codifica una proteína polimerasa de la presente invención para expresar dicha proteína a partir de dicho ácido nucleico con la secuencia; (b) recuperar la proteína del huésped o del medio de cultivo; y (c) purificar dicha proteína. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden estar unidas de forma operativa con los elementos reguladores en un vector de expresión, los cuales se introducen en una célula huésped elegida para producir la proteína bajo el control de las secuencias. Como realización específica, la expresión y purificación de la polimerasa P2 de ARN del bacteriófago $\phi 6$ se desarrolla en el ejemplo 1.

La expresión de la polimerasa de esta técnica se puede conseguir en cualquier célula huésped adecuada (por ejemplo, células animales, vegetales, fúngicas o bacterianas). En la realización actualmente preferente de la presente invención, el huésped de expresión es la bacteria *Escherichia coli*.

La proteína se aísla y purifica preferentemente mediante las etapas, que comprenden:

- (a) romper las células huésped en un tampón para obtener un lisado celular;
- (b) clarificar dicho lisado mediante centrifugación;
- (c) purificar la proteína utilizando, como mínimo, una etapa, más preferentemente dos etapas de cromatografía por afinidad;
- (d) purificar adicionalmente la proteína utilizando, como mínimo, una etapa de cromatografía de intercambio iónico para obtener una fracción que está esencialmente libre de actividades de nucleasa y proteasa.

El método de purificación comprende preferentemente:

- (i) purificar la proteína sobre Agarosa Azul;

(ii) purificar adicionalmente la proteína sobre Heparina-agarosa; y

(iii) purificar adicionalmente la proteína sobre Resource Q para obtener una fracción de proteína esencialmente libre de nucleasas y proteasas y que contiene, como mínimo, el 90%, más preferentemente, como mínimo, el 95% de la proteína polimerasa.

"Esencialmente libre de nucleasas y proteasas" significa en la presente invención que la preparación de proteína purificada no contiene una cantidad detectable de nucleasas y/o proteasas.

Síntesis de ARN sobre un sustrato de ARN *in vitro*

La presente invención se refiere a un método para la producción *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar sustrato de ARN de cadena simple o ARN de doble cadena;
- (b) poner en contacto dicho sustrato de ARN de cadena simple o ARN de doble cadena con la proteína de la presente invención bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN; y
- (c) recuperar la muestra de ARN de doble cadena recién producida de la mezcla de reacción.

Según una realización específica de la presente técnica, se observó que la polimerasa P2 iniciaba de novo y además catalizaba la síntesis de la cadena complementaria de longitud completa sobre un sustrato de ARN de cadena simple produciendo un producto de ARN de doble cadena del tamaño apropiado (figura 2, figura 3 y figura 5). La reacción basada en P2 purificada se puede considerar, por tanto, como el primer modelo *in vitro* de replicación fiable establecido para $\phi 6$, ya que el sistema basado en la procápside de $\phi 6$ dado a conocer previamente (Olkkonen y otros, 1990; Gottlieb y otros, 1990) no puede ayudar en la replicación a menos que se complete el empaquetamiento de ARN (Frilander y otros, 1992).

En una realización específica de esta técnica (figura 2), la mezcla de replicación de P2, además de la proteína P2, contenía sustrato de ARN m^+ de cadena simple (segmento m de sentido positivo del fago $\phi 6$), cuatro nucleótido trifosfatos (NTP) incluyendo $[\alpha^{32}P]UTP$ y el mismo tampón descrito para la síntesis de ARN en el sistema de procápside recombinante (Van Dijk y otros,

1995). El análisis de los productos de reacción mostró que la presencia de la proteína P2 se correlacionaba con la aparición de una nueva banda de ARN que migraba como una forma de doble cadena (M) del sustrato de ARN m^+ y visible tanto en un gel teñido con bromuro de etidio (EtBr) como el autorradiograma (figura 2). La intensidad de banda era proporcional a la cantidad de P2 añadida en el intervalo analizado (carriles 2-4). No apareció banda si P2 se sustituía por BSA o la mezcla de reacción carecía del sustrato de ARN (carriles 2 y 1).

La caracterización de los productos de replicación de P2 en el análisis de protección de ARNasa llevado a cabo tal como se muestra en la figura 3C demuestra inequívocamente que el ARN recién producido no tiene naturaleza de ARN de doble cadena. También es evidente a partir del experimento de separación de cadenas (figuras 3A y 3B) que en presencia de un segmento de ARN de sentido positivo (específicamente, segmento m^+), la polimerasa P2 sintetiza la cadena de ARN complementaria de sentido negativo.

Según una realización específica de la presente invención, la mezcla para la síntesis de ARN contenía de 0,01 a 0,1 mg/ml de P2 purificada (véase la figura 1, carril 6), de 40 μ g/ml a 300 μ g/ml de sustrato de ARN, Tris HCl 50 mM, pH 8,9, acetato de amonio (NH_4OAc) 80 mM, 1 mM de cada uno de ATP y GTP, 0,2 mM de cada uno de CTP y UTP, PEG4000 al 6% (p/v), MgCl_2 5 mM, MnCl_2 1 mM, DTT 2 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,2 mg/ml, y 800 u/ml de ARNasin. La mezcla de reacción se incubó a 28°C durante 1 h. También se ha observado que condiciones algo modificadas respaldan un nivel detectable de la síntesis de ARN. Específicamente, en el caso de utilizar una plantilla de ARN m^+ , estas condiciones modificadas pueden implicar uno o varios cambios seleccionados del grupo:

- (1) una concentración final diferente de proteína P2 en la mezcla de reacción (preferentemente de 0,005 a 0,4 mg/ml),
- (2) una preparación de proteína P2 menos purificada en la mezcla de reacción (figura 2, carril 3);
- (3) un tampón con un valor de pH diferente (preferentemente un pH de 7,3 a 9,3);
- (4) una concentración diferente de nucleósido trifosfatos (preferentemente de 0,2 a 3 mM de cada NTP);
- (5) una concentración diferente de PEG 4000 (preferentemente del 0 al 9%);

- (6) una concentración diferente de $MgCl_2$ (preferentemente de 0 a 10 mM, más preferentemente de 5 a 10 mM);
- (7) una concentración diferente de $MnCl_2$ (preferentemente de 0 a 3 mM)
- (8) una concentración diferente de BSA (preferentemente de 0 a 1 mg/ml);
- (9) una temperatura diferente de incubación (preferentemente de 20 a 42°C).

Sin embargo, es más ventajoso incrementar la concentración final tanto de ATP como de GTP hasta, como mínimo, 1 mM para la síntesis óptima de ARN (comparar, por ejemplo, los carriles 4 y 6 en la figura 2). También es altamente ventajoso incluir iones Mn^{2+} en la mezcla de reacción, ya que se observó que la adición de Mn^{2+} aumentaba considerablemente la síntesis de ARN (comparar, por ejemplo, los carriles 4 y 5 en la figura 2). Además, los presentes inventores han observado que la adición de un detergente no iónico, preferentemente Triton X-100 o Tween 20, preferentemente hasta la concentración final del 0,01 al 0,5%, es también ventajoso para la eficacia de la reacción. Los efectos estimuladores de los nucleótido trifosfatos de purina y el manganeso en la síntesis de ARN dependiente de ARN han sido descritos tanto para el complejo de polimerasas de $\phi 6$ (Van Dijk y otros, 1995) como para algunas otras polimerasas virales (Blumenthal, 1980, y las referencias en la misma).

En otra realización de la presente invención, se demostró que la polimerasa P2 replicaba varios sustratos diferentes de ARN de cadena simple tanto relacionadas con el fago $\phi 6$ como heterólogos. En primer lugar, se analizó un conjunto de diversos ARN de cadena simple específicos de $\phi 6$ en el análisis de polimerasa P2 (figura 5, carriles 1-8). Las copias exactas de los segmentos de ARN de cadena simple tanto grandes (l^+) como pequeños (s^+) del fago $\phi 6$ produjeron productos de ARN de doble cadena marcados que migran en el gel en las posiciones de L y S, respectivamente. La eficacia de la replicación de estos dos sustratos era muy próxima a la del ARN m^+ (figura 5, carriles 1-3) también utilizado como sustrato en las realizaciones descritas anteriormente. Se observó una eficacia de replicación comparable para los segmentos naturales de cadena simple aislados de la mezcla de transcripción de nucleocápside de $\phi 6$ (carril 8). Otra sustancia analizada fue el transcrito largo de 13,5 kb que consistía en segmentos s^+ , m^+ , y l^+ fusionados (Qiao y

otros, 1997). El producto de doble cadena en este caso migró de manera notablemente más lenta que el segmento L indicando una replicación completa o casi completa. Vale la pena indicar que se conserva la parte terminal en 3' de 70-80 bases de largo de los tres segmentos de $\phi 6$ y se cree que forman una estructura secundaria amplia (Mindich y otros, 1994). Todos los sustratos de ARN mencionados anteriormente contenían esta característica y eran replicables. De este modo, era interesante estudiar el posible efecto de la secuencia proximal en 3' sobre la replicabilidad *in vitro* del ARN. Se sintetizó un segmento s⁺ truncado que carecía de 158 nucleótidos en el extremo 3' y se utilizó como sustrato en la reacción de replicación (carril 4). De manera sorprendente, no se observó reducción en el rendimiento del producto. Por el contrario, la eficacia de la replicación fue algo más elevada que la del s⁺ no modificado. Se detectó una replicación incluso más eficaz para el ARN s⁺ extendido con 13 nucleótidos extra originarios del plásmido polienlazador (carril 5). Sin embargo, la adición de 31 nucleótidos polienlazadores al segmento s⁺ redujo de manera significativa el rendimiento del producto de ARN de doble cadena (carril 6). De este modo, se concluyó que: 1) ni la estructura secundaria conservada ni la secuencia específica de $\phi 6$ en el extremo 3' de un sustrato de ARN son críticas para la replicación *in vitro* dirigida por P2; sin embargo, 2) la eficacia de la replicación sí depende de la secuencia en el extremo 3' del sustrato. En segundo lugar, también se demostró que la polimerasa P2 replicaba de manera eficaz un conjunto de plantillas de ARN de cadena simple heterólogo, no relacionadas con ninguno de los tres segmentos de ARN de $\phi 6$. Todos los ARN analizados resultaron ser sustratos adecuados para la reacción de replicación, aunque el rendimiento del ARN de doble cadena producido dependía de la naturaleza de la plantilla de entrada (figura 5, carriles 9-12). La mezcla de los transcritos de fago T7 dio lugar a una síntesis muy eficaz de varias muestras de ARN de doble cadena (carril 9). Las plantillas eficaces fueron el ARN mensajero de la luciferasa de luciérnaga y los transcritos de sentido positivo del virus de la lengua azul (carriles 10 y 12). La replicación del ARN genómico del colifago MS2 era ineficaz de manera reproducible conduciendo a un producto de ARN de doble cadena apenas visible en el gel teñido con EtBr original. Incluso en este caso, la banda del producto era claramente detectable en el autorradiograma (carril 11). Adicionalmente, también eran

replicables con la proteína P2 (datos no mostrados) otros ARN, concretamente ARNm que codificaban tiorredoxina (transcrito T7 de pET32b(+)) cortado con *XhoI*), proteína verde fluorescente (transcrito T7 de pTU58 cortado con *EcoRI*) y luciferasa de luciérnaga fusionada con neomicina fosfotransferasa II (transcrito T7 de pTZluc(NPT2) cortado con *XhoI*), y una mezcla de ARN ribosomales 16S y 23S de *E. coli* (Boehringer). También vale la pena indicar que la enzima mostró una procesividad elevada, siendo capaz de replicar las plantillas de ARN hasta 13,5 kb de longitud (figura 5, carril 7) y probablemente incluso más largas (figura 5, carril 9).

La replicación completa y eficaz de diferentes plantillas de ARN de cadena simple sugiere un método general para la producción *in vitro* de ARN de doble cadena utilizando la proteína polimerasa de la presente invención. Este método parece ser particularmente útil conociendo la importancia del ARN de doble cadena como potente regulador de muchos procesos celulares (Sharp, 1999). Durante varias décadas, se han conocido moléculas de ARN de doble cadena como potentes inhibidores de la traducción en eucariotas superiores. Recientemente, se ha demostrado que el ARN de doble cadena provoca la denominada interferencia de ARN (ARNi) en algunos animales, tales como insectos, nematodos, tripanosomas y el pez cebra. La información adicional sobre los mecanismos bioquímicos mediados por el ARN de doble cadena proviene de plantas que se ha observado que responden al ARN de doble cadena en forma de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). De manera destacada, tanto el ARNi como PTGS son mecanismos específicos de secuencia que implican que la expresión de un gen diana sea inhibida con un fragmento de ARN de doble cadena que tiene una secuencia homóloga al gen o a su parte. Más ejemplos de regulación dependiente de ARN de doble cadena se descubrirán probablemente en el futuro más próximo. En este aspecto, el método dado a conocer para la síntesis de ARN de doble cadena con la secuencia predeterminada representa un gran avance genuino tanto en investigación como en posibles aplicaciones de mecanismos desencadenados por ARN de doble cadena. En una realización preferente de la presente invención, la polimerasa utilizada en el método de la producción de ARN de doble cadena es la ARN polimerasa P2 originaria del bacteriófago $\phi 6$. El sustrato de ARN de cadena simple para el método se puede producir *in vitro* o purificar a

partir de fuentes celulares o virales. Las condiciones adecuadas para la replicación del ARN de cadena simple pueden ser tal como se ha descrito en una realización específica de esta técnica (véase el ejemplo 2) o pueden modificarse de manera que no comprometa la producción de una cantidad detectable del producto de ARN de doble cadena. Dependiendo de las necesidades e intenciones del usuario, el ARN de doble cadena producido se puede utilizar con o sin purificación adicional de los otros componentes de la mezcla de reacción.

En una realización específica de la presente técnica, también se observó que P2 utilizaba ARN de doble cadena, purificada de $\phi 6$ o de genomas de ARN de doble cadena no específicos de otros virus (L-A, BTV, CPV), como plantillas para la síntesis de ARN (figura 8 y no mostrado). En la presente invención, a la reacción de síntesis de ARN en presencia de un sustrato de ARN de doble cadena se hace referencia como transcripción de ARN. Como resultado de la transcripción de ARN, el ARN recién sintetizado forma dobles cadenas con la cadena de plantilla de la plantilla del ARN de doble cadena y desplaza la cadena que no es de la plantilla antigua. En el caso del sustrato de ARN de doble cadena derivado de $\phi 6$, se observa que P2 sintetiza predominantemente el ARN de cadena positiva (figura 9).

Síntesis de ARN sobre el sustrato de ADN

La presente invención se refiere a un método para la producción *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar sustrato de ADN de cadena simple o ADN de doble cadena;
- (b) poner en contacto dicho sustrato de ADN de cadena simple con la proteína de la presente invención bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN; y
- (c) recuperar de la mezcla de reacción las muestras de ácido nucleico recién producido.

Además de los ARN de doble cadena naturales, P2 también cataliza la transcripción de ARN sobre plantillas de ARN de doble cadena sintético (figura 9A, m⁺ preparado a partir de ARN de cadena simple utilizando el método para la producción de ARN de doble cadena reivindicado en la presente invención. De manera específica, se utilizaron las siguientes etapas para preparar sustrato de ARN de doble cadena sintético para el experimento anterior (véase también el ejemplo 2 para más detalles):

- a) producción de ARN de cadena simple m^+ utilizando una transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa de T7 de un plásmido linealizado que contiene una copia de ADN m^+ bajo el control de un promotor de T7;
- b) replicación del ARN de cadena simple m^+ con la polimerasa P2; y
- c) posterior purificación del ARN de doble cadena recién formado del segmento M a través de un gel de agarosa al 1% para conseguir la separación de dicho ARN de doble cadena respecto a otros componentes de la mezcla de replicación.

Según algunas realizaciones adicionales de la técnica, se observó que un grupo de ADN de cadena simple (ejemplificado por desoxirribonucleótidos sintéticos, ADN de cadena simple lineal del fago M13) era replicable con P2 (figura 10A y no mostrado) bajo condiciones similares a las descritas anteriormente para ARN de cadena simple. La reacción da lugar a dobles cadenas que consisten en un ADN plantilla y una réplica del ARN recién producido. Además, se observa que algunos ADN de doble cadena lineales sirven como plantillas para la síntesis de ARN catalizada por P2 (figura 10B). De nuevo, como en el caso de las plantillas de ARN, los ADN de cadena simple son sustratos mucho más eficaces que los de doble cadena.

Condiciones para la síntesis de ARN sobre sustratos de ARN y ADN

El método para producir ARN *in vitro* comprende:

- proporcionar sustrato de ARN o ADN;
- poner en contacto dicho sustrato de ARN o ADN con la proteína de la presente invención bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN en una mezcla que comprende:
 - (a) sustrato de ácido nucleico, preferentemente de 40 a 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$;
 - (b) proteína de las reivindicaciones 1 a 5, preferentemente de 0,005 a 0,5 mg/ml ;
 - (c) tampón, preferentemente pH 7,3-9,3;
 - (d) iones MgCl_2 , preferentemente de 0 a 10 mM, más preferentemente de 5 a 10 mM;
 - (e) nucleósido trifosfatos, preferentemente de 0,2 a 3 mM de cada NTP;
 - (f) PEG, preferentemente del 0 al 9%;
 - (g) acetato de amonio, preferentemente de 0 a 200 mM;

- (h) $MnCl_2$, preferentemente de 0 a 3 mM;
- (i) BSA, preferentemente de 0 a 1,0 mg/ml;
- (j) DTT, preferentemente de 0 a 5 mM;
- (k) un detergente no iónico, preferentemente del 0 al 0,5%

- incubar la mezcla de reacción entre 20 y 42°C, y
- recuperar de la mezcla de reacción las muestras de ácido nucleico recién producido.

Método para la amplificación *in vitro* de ARN

La presente invención se refiere a un método para la amplificación *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar sustrato de ARN;
- (b) poner en contacto dicho sustrato de ARN con la proteína de cualquiera de las de la presente invención bajo condiciones suficientes tanto para la replicación de ARN como para la transcripción de ARN; y
- (c) recuperar de la mezcla de reacción una mezcla del ARN amplificado recién producido.

La presente invención se refiere además a un método que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar sustrato de ARN de cadena simple;
- (b) replicar dicho sustrato de ARN de cadena simple con la proteína de la presente invención para formar ARN de doble cadena;
- (c) transcribir dicho ARN de doble cadena con la proteína de la presente invención para obtener ARN de cadena simple; y
- (d) repetir las etapas de amplificación hasta haber obtenido una cantidad suficiente de productos de síntesis de ARN.

De manera destacada, la transcripción impulsada por P2 del segmento M sintético (figura 9, M) se llevó a cabo bajo condiciones indistinguibles de las utilizados preferentemente para la replicación de m^+ . Este hecho permite sugerir que el ARN de doble cadena recién formado en la replicación catalizada por P2 de un sustrato de ARN de cadena simple pueda servir como plantilla para la transcripción catalizada por P2. Dichos hechos simultáneos de replicación y transcripción en un único tubo de ensayo implican que una reacción programada con un sustrato de ARN de cadena simple no dará lugar solamente a muestras de ARN de doble cadena (productos de la replicación del ARN de cadena simple de entrada), sino también a muestras de ARN de cadena simple (productos de

transcripción de la muestra de ARN de doble cadena recién formado). Como mínimo, algunos de los ARN de cadena simple recién formados tendrán la misma polaridad que el sustrato de ARN de cadena simple de entrada, implicando, de este modo, la amplificación del sustrato de entrada en la mezcla de reacción que contenía P2. En principio, el ARN de cadena simple recién producido mencionado anteriormente podría a su vez someterse a una ronda adicional o incluso varias rondas de dicha amplificación. En base a este esquema, la presente invención da a conocer un método para la amplificación de ARN que consiste en las etapas de: a) proporcionar un sustrato de ARN; b) poner en contacto este ARN con la proteína polimerasa de la presente invención; recuperar el ARN amplificado. Bajo las condiciones actualmente preferentes, la transcripción de ARN de doble cadena es algo menos eficaz que la replicación de ARN de cadena simple calculada utilizando un análisis con fosfoimágenes de las intensidades de banda.

La presente invención se refiere también a un método para la producción *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un sustrato de ARN de cadena simple mediante la transcripción de una plantilla de ADN con una ARN polimerasa dependiente de ADN; y
- (b) replicar dicho sustrato de ARN de cadena simple con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para formar ARN de doble cadena.

Este método se puede utilizar en un método para la amplificación *in vitro* de ARN que comprende además las etapas de:

- (c) transcribir dicho ARN de doble cadena con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para obtener ARN de cadena simple; y
- (d) repetir las etapas de amplificación hasta haber obtenido una cantidad suficiente de productos de síntesis de ARN.

En una realización específica de la presente invención, se puede proporcionar sustrato de ARN de cadena simple para la replicación catalizada por P2 mediante la transcripción de plantillas de ADN con una ARN polimerasa dependiente de ADN. En un caso preferente, la ARN polimerasa dependiente de ADN deriva de un bacteriófago. Lo más ventajoso es que el bacteriófago se seleccione del grupo que consiste en los bacteriófagos T7, T3, y SP6. En algunas realizaciones de la técnica, dicha transcripción de una plantilla de ADN con una ARN polimerasa dependiente de ADN y la

replicación catalizada por P2 del ARN de cadena simple lineal recién producido puede tener lugar en el mismo recipiente de reacción. Se llevaron a cabo experimentos especiales a efectos de demostrar la posibilidad de la última estrategia. En estos experimentos, el ADN de doble cadena lineal que contenía el promotor de la ARN polimerasa de T7 (concretamente, pLM659 cortado con *Sma*I) se incubó tanto con ARN polimerasa de T7 como con ARN polimerasa P2 bajo esencialmente las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 2 para la replicación de ARN catalizada por P2, a excepción de que la temperatura fue de 37°C. Los productos de reacción comprendían esencialmente la mezcla de ARN de cadena simple y ARN de doble cadena que migran en la electroforesis en gel de agarosa estándar en las posiciones de los segmentos s⁺ y S correspondientes de $\phi 6$ (no mostradas). Sólo se formaron muestras de ARN de cadena simple cuando se omitió P2 de la mezcla de reacción.

En base a los hallazgos indicados anteriormente, la presente invención da a conocer métodos para la producción de ARN utilizando la polimerasa de la presente invención en contacto con plantillas de ácido nucleico diferentes. Algunos de estos métodos se diseñan para ser utilizados para aplicaciones especiales, tales como el incremento de la estabilidad de ácidos nucleicos, secuenciación independiente de cebador y extensión con cebador.

Método para la estabilización de ácidos nucleicos

La presente invención se refiere a un método para la estabilización de ácidos nucleicos, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar sustrato de ácido nucleico de cadena simple;
- (b) poner en contacto dicho sustrato de ácido nucleico de cadena simple con la proteína de la presente invención bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN a efectos de convertir, como mínimo, parte del sustrato de ácido nucleico de cadena simple en la forma de ácido nucleico de doble cadena;
- (c) recuperar de la mezcla de reacción los ácidos nucleicos totales;

el método puede comprender opcionalmente las etapas adicionales de:

- (d) poner en contacto dichos ácidos nucleicos totales con una preparación que contiene una nucleasa o nucleasas que degradan selectivamente los ácidos nucleicos de cadena simple, pero no los ácidos nucleicos de doble cadena; y

(e) recuperar los ácidos nucleicos de doble cadena que muestran una mayor estabilidad a la degradación por nucleasas.

El método de incrementar la estabilidad de un ácido nucleico de cadena simple se basa en el fenómeno de que los ácidos nucleicos de doble cadena son resistentes a la degradación por nucleasas específicas de las cadenas simples bajo ciertas condiciones (tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 3C).
Determinación de la secuencia de bases nucleotídicas de un ácido nucleico lineal

La presente invención se refiere a un método para la determinación de la secuencia de bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico lineal, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una molécula de ácido nucleico lineal;
- (b) incubar dicha molécula de ácido nucleico bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN en una mezcla que comprende:

- proteína de la presente invención;
 - cuatro nucleósido trifosfatos o análogos funcionales de los mismos; y
 - como mínimo, uno de cuatro agentes de terminación de la síntesis de ARN que terminan la síntesis de ARN en una base nucleotídica específica,
- donde cada uno de dichos agentes termina la síntesis de ARN en una base nucleotídica diferente;

y

- (c) separar los productos de ARN terminados de la reacción de incubación según su tamaño, mediante lo cual se puede determinar, como mínimo, una parte de la secuencia de bases nucleotídicas de dicha molécula de ácido nucleico.

El método de la secuenciación enzimática independiente de cebador de un ácido nucleico depende del hecho de que la polimerasa de la presente invención (proteína P2 en una realización preferente) puede iniciar la síntesis de ARN 1) sin cebadores y 2) empezando desde el nucleótido del extremo 3' de una plantilla de ácido nucleico (ARN de cadena simple en una realización preferente) (figura 7). Debido a esta última característica, las cadenas de ARN recién producidas tendrán un extremo 5' uniforme en el caso de que la preparación de plantilla sea homogénea. De manera ventajosa, se ha demostrado que la polimerasa de la presente invención es capaz

de incorporar 3'-desoxinucleótidos en la cadena de ARN creciente dando lugar a una terminación de cadena en posiciones específicas (no mostrado). En la técnica anterior (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 5173411 y las referencias en la misma; y Axelrod y Kramer, 1985) se han descrito varios métodos de secuenciación de ácidos nucleicos basados en las reacciones de polimerización de ADN o ARN. En todos estos métodos, la polimerización provoca la terminación en bases específicas a través de la incorporación de agentes terminadores de cadena específicos en las bases, por ejemplo, didesoxinucleótidos (para ADN polimerasas) o 3'-desoxinucleótidos (para ARN polimerasas). En el caso de secuenciación basada en ADN polimerasas, la polimerización se inicia a partir de un cebador complementario a la plantilla de interés. Las ARN polimerasas dependientes de ADN se han utilizado para secuenciar ADN sin cebadores (Axelrod y otros, 1985). Sin embargo, en este caso, la plantilla de ADN debe contener un promotor específico para el inicio de la síntesis de ARN. De manera ventajosa, el método de secuenciación de ácidos nucleicos de la presente técnica no requiere ni cebador ni promotor. La única limitación de este método es la presencia de un extremo 3' libre en el polinucleótido a secuenciar.

Método de extensión con cebador

La presente invención también da a conocer un método para la extensión con cebador utilizando la polimerasa de la presente invención. El método de la extensión con cebador se basa en la observación realizada en una realización específica de la presente invención, donde se utilizó P2 para sintetizar ARN en presencia de una plantilla de ácido nucleico que comprende esencialmente una plantilla de ARN de cadena simple y un cebador de desoxirribooligonucleótidos marcado complementario a una parte interna de dicha plantilla. Se observó que la polimerasa P2 podía extender el cebador mediante la adición de nucleótidos a su extremo 3'. Este tipo de síntesis de ARN dependía completamente de la presencia de la plantilla de ARN de cadena simple. El tamaño del producto de reacción principal concordaba con la suposición de que la polimerización de ARN comienza desde el extremo 3' del cebador y continúa hasta que la polimerasa alcanza el extremo 5' de la plantilla de ARN de cadena simple (no mostrada).

Kit para la síntesis *in vitro* de ARN y para la secuenciación

La presente invención también da a conocer kits para la síntesis *in vitro* de ARN. Los kits incluyen una preparación de la proteína polimerasa de la presente invención y aditivos necesarios para un nivel adecuado de la síntesis de ARN. La posible naturaleza de estos aditivos se entiende fácilmente a partir de la descripción detallada de la síntesis *in vitro* de ARN (ejemplos 2 y 3). Los aditivos comprenden habitualmente tampones, sales, PEG y/o DTT. En una realización específica de la presente invención, el kit puede contener nucleósido trifosfatos y/o una preparación (o preparaciones) de ácidos nucleicos que se ha observado que estimulan la síntesis detectable de ARN. En otra realización específica, la mezcla de nucleósido trifosfatos también puede contener, como mínimo, un nucleósido trifosfato modificado para contener un marcador detectable.

La presente invención da a conocer también un kit utilizado de manera específica para la secuenciación. Dicho kit comprende, como mínimo, un agente terminador de la síntesis de ARN que termina la síntesis de ARN en una base nucleotídica específica. Incorporación de nucleótidos modificados químicamente en el producto de ARN

Además de los nucleósido trifosfatos normales o marcados radioactivamente, los presentes inventores han demostrado que una polimerasa de la presente invención incorpora nucleótidos modificados químicamente en el producto de ARN. Esta incorporación posibilita un análisis de la síntesis de ARN que utiliza metodología no radioactiva, tal como la basada en la detección por fluorescencia o quimioluminiscencia. Los productos de ARN que contienen marcadores fluorescentes u otros marcadores no radioactivos también se pueden utilizar, por ejemplo, como sondas de ARN.

En una realización preferente, las mezclas de replicación de P2 estándar que contienen un sustrato de ARN de cadena simple se complementaron con 0,02 a 0,1 mM de Alexa Fluor®488-5-UTP (Molecular Probes), coumarin-5-CTP (New England Nuclear), o biotin-11-CTP (New England Nuclear). Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 30 °C. A continuación, las mezclas de reacción se pasaron a través de columnas de centrifugación AutoSEC G-50 (Pharmacia) para purificar productos de ARN de los análogos de nucleótidos no reaccionados y de los otros contaminantes de peso

molecular bajo. A continuación, se midió la incorporación de los análogos de nucleótidos en el ARN recién producido en las fracciones que atravesaban el filtro utilizando un espectrofluorómetro (en el caso de Alexa Fluor®488-5-UTP y coumarin-5-CTP) o un análisis de transferencia por puntos (para biotin-11-CTP). En cada uno de estos casos, se encontró una parte detectable del análogo en la fracción del producto de ARN (figura 11).

EJEMPLO 1

Expresión y purificación de polimerasa P2 recombinante de bacteriófago $\phi 6$

Construcción de la cepa productora de P2

Para construir un plásmido para la expresión de la proteína P2, se amplificó el gen de P2 (SEC ID NO: 1) a partir de una plantilla de pLM687 (Mindich y otros, 1994) con la ADN polimerasa recombinante de *Pfu* (Stratagen) y los oligonucleótidos 5'-GGTAAGCGCCATATGCGGAGGAGA-3' (SEC ID NO. 2) y 5'-TACGAATTCCGGCATGATTACCTAGGCATTACA-3' (SEC ID NO. 3), que actúan como cebadores en dirección 5' y en dirección 3', respectivamente. El fragmento de PCR digerido con *NdeI* y *EcoRI* (sitios subrayados en las secuencias de los cebadores) se purificó en gel y se unió con el fragmento grande del vector pET32b(+) cortado con *NdeI-EcoRI* (Novagen). Se transformó el BL21(DE3) de *E. coli* (Studier y Moffatt, 1986; adquirido de Novagen) con el plásmido resultante pEM2 para producir la cepa productora de P2 BL21(DE3/pEM2). Se determinó la secuencia del inserto de P2 completo (SEC ID NO: 8). Se encontró un único cambio de aminoácido, Ile457 a Met, cuando se comparó con la secuencia de la proteína publicada (Banco de genes, AAA32355). También se encontró un codón de metionina en esta posición en el plásmido pLM687 que se había utilizado como plantilla para la amplificación génica. Este plásmido contiene la copia de ADNc del segmento genómico grande completo del fago $\phi 6$ y se ha utilizado anteriormente en experimentos de genética inversa para producir partículas de virus viables (Mindich y otros, 1994). De este modo, el cambio observado no perjudica a la actividad de P2 en el virus.

Expresión y purificación de la proteína P2 recombinante

La purificación de la proteína P2 se siguió mediante SDS-PAGE en gel de acrilamida al 12,5% (Olkkonen y Bamford, 1989) y mediante inmunotransferencia con anticuerpos policlonales de conejo

desarrollados contra partículas del complejo de polimerasas (PC) recombinantes (Frilander y Bamford, 1995). La cepa BL21(DE3/pEM2) produjo una cantidad detectable de la proteína P2 soluble entre 15 y 23°C valorada mediante análisis SDS-PAGE e inmunotransferencia (figura 1, carriles 1-3). Vale la pena mencionar que la expresión entre 28 y 37°C condujo a una producción mucho más elevada de P2, con casi toda la proteína sintetizada en una forma insoluble (no mostrado). Para conseguir la expresión de P2 soluble, se desarrolló a 37°C con agitación un cultivo de partida de BL21(DE3/pEM2) en el medio LB que contenía 150 mg/ml de ampicilina hasta que la DO540 llegó a 0,5. A continuación, éste se diluyó 50 veces en 3 L del mismo medio. El cultivo diluido se desarrolló posteriormente a 37°C hasta una DO540 de 1,0. El cultivo se enfrió en hielo y se indujo con 1 mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Las células inducidas con IPTG se transfirieron a continuación hasta 15°C, donde se agitaron durante 18 h (véase la figura 1, carriles 1-2). De forma alternativa, se realizó la expresión a 20-23°C agitando el cultivo inducido durante 14 horas. Todas las siguientes etapas, a menos que se indique lo contrario, se realizaron a 4°C. Se recogieron las bacterias mediante centrifugación y se resuspendieron en 30 ml de tampón A1 (NaCl 100 mM, Tris HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). La suspensión se pasó 3 veces a \sim 105 MPa a través de una celda de presión francesa preenfriada. Se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 1 mM después del primer pase. El lisado se centrifugó a 120.000 g durante 2 h 30 min. La fracción sobrenadante (figura 1, carril 3) se cargó en una columna de afinidad con colorante (Cibacron Blue 3GA, Sigma). Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con tampón AS (NaCl 500 mM, Tris HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Las fracciones recogidas que contenían P2 (figura 1, carril 4) se diluyeron cinco veces con agua destilada enfriada en hielo y se aplicaron sobre una columna de heparina-agarosa (Sigma). Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0,1 a 1 M de NaCl tamponado con Tris HCl 50 mM, pH 8,0 y EDTA 1 mM. Las fracciones que contenían P2 (figura 1, carril 5) se agruparon y diluyeron diez veces con Tris HCl 20 mM, pH 8,0, se filtraron e inyectaron en una columna Resource Q (Pharmacia; temperatura ambiente). La elución de las proteínas unidas se realizó con un gradiente de 0 a 0,5 M de NaCl tamponado con Tris HCl 50 mM, pH 8,0 y EDTA 0,1 mM. P2 se eluyó como un único pico a aproximadamente NaCl 90-100 mM (figura 1, carril 6). La

concentración de la proteína P2 purificada se determinó mediante la absorbancia a 280 nm en clorhidrato de guanidina 6 M (en base al valor de 1,39 por 1 mg/ml calculado para la proteína no plegada; Edelhoeh, 1967). El rendimiento estimado de la proteína purificada fue de aproximadamente 1 mg por litro del cultivo bacteriano. Normalmente se obtuvieron rendimientos algo mejores cuando P2 se expresó entre 20 y 23°C. La P2 purificada se almacenó en hielo durante hasta un mes sin pérdida detectable de actividad o integridad de la proteína.

EJEMPLO 2

Replicación de ARN

Cepas bacterianas y plásmidos

DH5 α de *Escherichia coli* (Gibco-BRL) fue el huésped para la propagación del plásmido y la clonación molecular. Los plásmidos pLM659 (Gottlieb y otros, 1992b), pLM656 (Olkkonen y otros, 1990) y pLM687 (Mindich y otros, 1994) permitieron la producción de las copias de ARN de cadena simple de sentido positivo de los segmentos genómicos del bacteriófago s⁺, m⁺ y 1⁺, respectivamente. Se utilizó el plásmido pLM1809 (Qiao y otros, 1997) para la síntesis de un ARN largo que contenía los segmentos s⁺, m⁺ y 1⁺ fusionados. Se utilizó el plásmido pGEMluc (Promega) para producir el ARNm de luciferasa de *Photinus pyralis*. Los plásmidos pTU58 (Chalfie y otros, 1994) y pTZluc(NPT2) (Makeyev y otros, 1996) fueron las plantillas para la producción de ARNm que codificaban la proteína verde fluorescente y la fusión translacional de luciferasa de luciérnaga y neomicina fosfotransferasa II.

Preparación de sustratos de ARN de cadena simple

Se prepararon sustratos sintéticos de ARN de cadena simple mediante transcripción *in vitro* con ARN polimerasas de SP6 (para pGEMluc) o T7 (para el resto de plantillas de ADN). Los ARN no marcados se produjeron en mezclas de transcripción de 50 μ l, en principio tal como se ha descrito en Makeyev y otros, 1996. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 2 horas y, a continuación, se detuvieron mediante la adición de 1 unidad de ADNasa RQ (Promega) por 1 μ g de plantilla de ADN de entrada. La incubación se continuó durante 15 min adicionales a 37°C. Las preparaciones de ARN se extrajeron sucesivamente con fenol/cloroformo (1:1) y cloroformo, se precipitaron con LiCl 3 M y se disolvieron en agua estéril. El ARN m⁺ marcado se sintetizó tal como recomienda Promega. La mezcla

(25 μ l) contenía 1 mCi/ml de [α^{32} P]UTP (Amersham, 3000 Ci/mmol), 20 unidades de ARNasin, 4 μ g de pLM656 tratado con XbaI (NEB) y nucleasa de habas de mung (Promega), y 40 unidades de ARN polimerasa de T7. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora y, a continuación, se procesó tal como se ha descrito para transcritos no marcados con la única excepción de que el ARN marcado se purificó adicionalmente pasando a través de una columna de centrifugación Sephadex G25 (Pharmacia) después de la etapa de precipitación con LiCl. Se preparó una mezcla de los transcritos naturales de $\phi 6$ (segmentos de cadena simple s⁺, m⁺, y l⁺) utilizando una transcripción dirigida por nucleocápside (Bamford y otros, 1995), seguido de extracción con fenol y tres precipitaciones sucesivas con LiCl. La concentración de ARN se midió mediante densidad óptica a 260 nm. La calidad de los ARN se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (PAAG) que contenía urea 7,5 M o en el gel de agarosa estándar al 1% (Pagratis y Revel, 1990).

Análisis de la síntesis in vitro de ARN

La actividad de replicación de la proteína P2 preparada tal como se ha descrito en el ejemplo 1 se analizó habitualmente en una mezcla de reacción de 10 μ l que contenía Tris HCl 50 mM, pH 8,9, acetato de amonio 80 mM (NH₄OAc), PEG4000 al 6 % (p/v), MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, EDTA 0,1 mM, 1 mM de cada uno de ATP y GTP, 0,2 mM de cada uno de CTP y UTP (los cuatro nucleótido trifosfatos de Pharmacia), BSA 0,2 mg/ml (libre de nucleasa, NEB), y ARNasin 0,8 u/ μ l. La concentración final de los sustratos de ARN añadidos variaba desde 40 μ g/ml hasta 300 μ g/ml. A menos que se indique lo contrario, la mezcla se complementó con 0,25-0,5 mCi/ml de [α^{32} P]UTP (Amersham, 3000 Ci/mmol). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 0,2-2 μ l de la preparación de proteína P2. En las reacciones de control ("solo tampón"), la P2 se sustituyó con un volumen igual del tampón P2 (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 90 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,2 mg/ml). Las mezclas de incubaron a 28°C durante 1 hora y se procesaron para un análisis posterior. Se utilizaron en este estudio para el análisis de ARN dos tipos de electroforesis en gel de agarosa, ambas originalmente descritas por Pagratis y Revel (1990). El primer tipo de electroforesis utilizado, o estándar, para conseguir la separación del ARN de cadena simple de sentido positivo y los correspondientes segmentos

de ARN de doble cadena, se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% que contenían 0,25 µg/ml de EtBr y se tamponó con 1xTBE (Tris-borato 50 mM, pH 8,3, EDTA 1 mM). Para el análisis de los productos de polimerización de P2, la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de tampón U2 (Urea 8 M, EDTA 10 mM, SDS al 0,2%, glicerol al 6% (v/v), azul de bromofenol al 0,05% y xileno cianol FF al 0,05%). Después de la separación de ARN (5 V/cm), los geles se irradiaron con luz UV y se fotografiaron. Para determinar la posición de las bandas marcadas radioactivamente, los geles se secaron y se expusieron con una película Fuji Super RX. La figura 2 y la figura 5 muestran resultados habituales de la replicación de ARN catalizada por P2 analizada mediante electroforesis estándar.

La segunda técnica fue el análisis con gel de separación de cadenas. En este caso, la electroforesis se realizó en agarosa al 1% tamponado con 1xTBE y no contenía EtBr. Las muestras para el análisis se prepararon deteniendo las mezclas de reacción de P2 con 4 volúmenes de EDTA 100 mM, seguido de extracciones con fenol/cloroformo (1:1) y cloroformo. La fase acuosa se llevó a 2,5 M en NH₄OAc y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol. Los residuos se disolvieron en tampón U2 diluidos dos veces con agua estéril. Cuando fue apropiado, las muestras se hirvieron durante 3 min y, a continuación, se colocaron sobre hielo durante otros 3 min. Después de la separación de ARN (5 V/cm), los geles se tiñeron con EtBr y se procesaron tal como se indica para los geles estándar. Se utilizaron análisis separadores de cadenas para revelar la naturaleza del producto de ARN recién sintetizado. A menos que se tratara con calor, el producto radioactivo de la reacción catalizada por P2 programada con la plantilla de m⁺ migró en el gel de separación de cadenas en la posición del segmento M de doble cadena (figuras 3A y B), tal como se observó en el experimento previo. Sin embargo, la movilidad del producto cambió a la de la cadena negativa (m⁻) del segmento M después de la etapa de desnaturalización por calor. De este modo, se concluyó que la proteína P2 catalizaba la síntesis de la cadena negativa complementaria a la plantilla de cadena positiva de entrada, es decir, la reacción de replicación.

Análisis de protección de ARNasa

En el siguiente experimento, se comprobó si las dobles cadenas del sustrato de ARN y la cadena recién sintetizada poseían

propiedades de una molécula de ARN de doble cadena. El correspondiente experimento se basaba en el hecho de que la ARNasa I de *E. coli* hidroliza fácilmente el ARN de cadena simple y parcialmente el ARN de doble cadena, pero no las dobles cadenas perfectas de ARN (Brewer y otros, 1992). El análisis de protección de ARNasa se realizó en mezclas de reacción de 10 μ l que contenían Tris HCl 10 mM (pH 7,5), NH_4OAc 200 mM, EDTA 5 mM, 1 unidad de ARNasa I (RNase ONE; Promega) y la muestra de ARN purificada con extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol de la mezcla de análisis de la polimerasa P2. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 28°C y se detuvo mediante la adición de SDS al 0,1% y 10 μ g de ARNt de *E. coli* (Sigma). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa estándar. Tal como resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la figura 3C, el producto de replicación (dobles cadenas de m^+ y m^-) era casi totalmente resistente a la digestión con ARNasa, mientras que el sustrato de ARN (m^+) se degradaba completamente bajo las mismas condiciones. De este modo, el producto de replicación representaba el ARN de doble cadena perfecto compuesto de cadenas m^+ y m^- complementarias.

Filtración en gel analítico

La asociación directa de la actividad de síntesis de ARN con la proteína P2 se observó utilizando filtración en gel no desnaturante. Se realizó una cromatografía a temperatura ambiente en una columna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) utilizando un tampón que contenía Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM y EDTA 0,1 mM y un caudal de 0,5 ml/min. Las proteínas y el Azul de Dextrano utilizado para la calibración eran de Sigma, a excepción de la IgG de ratón purificada (Zymed) y el inhibidor de tripsina de soja (Boehringer). Habitualmente, se inyectaron 200 μ g de P2 purificada en la columna y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se analizó en alícuotas de un microlitro para cada una de las fracciones la actividad replicasa con el sustrato de ARN m^+ tal como se ha descrito anteriormente. Como resultado, se observó que P2 migraba como un único pico con una masa molecular aparente de 45 kDa (figura 4), mientras que la masa molecular real de P2 es de 75 kDa. Esta diferencia no se podía explicar por la degradación de la proteína (véase SDS-PAGE en las figuras 1 y 4A). La posible interacción de la proteína con la matriz de filtración en gel (Sephadex) también parecía ser una explicación improbable, ya que

se obtuvo de forma similar un peso molecular aparente bajo con una columna diferente (Ultrahydrogel 500, Waters, no mostrado). Por lo tanto, es razonable proponer que la proteína es un monómero esférico muy compacto en solución. Esta conclusión se confirmó adicionalmente mediante los datos preliminares de la dispersión de luz (R. Tuma, resultados no publicados). La actividad polimerasa sólo se observó en el pico de proteína, indicando de este modo que P2 posee la actividad de ARN polimerasa por sí sola y la actividad está asociada con el monómero de P2.

Sitio de inicio y velocidad de elongación de P2

Se han utilizado algunas estrategias adicionales para caracterizar el inicio y la elongación de la replicación *in vitro* impulsada por P2.

(a) El análisis de extensión con el cebador (figura 7) mostró que, como mínimo, en el caso del segmento s^+ de longitud completa, la P2 purificada inicia la replicación a partir del nucleótido terminal en 3' de la plantilla como en la replicación real *in vivo* con $\phi 6$. El análisis se realizó en mezclas de reacción de 10 μ l que contenían Tris HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, espermidina 0,5 mM, 0,6 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótido trifosfatos, y 5 unidades de transcriptasa inversa de AMV (Promega). Como cebador, la reacción contenía 0,5 pmol de oligonucleótido (5'-GGATAACAAGTCCTTGTATAAC-3') (SEC ID NO. 4) marcado en el extremo terminal con polinucleótido quinasa (Promega) y [γ^{32} P]ATP (Amersham, 3000 Ci/mmol). El cebador se diseñó para que fuera complementario a la cadena negativa del segmento pequeño (s) del genoma de $\phi 6$. El ARN desnaturalizado para el análisis se preparó de la siguiente manera: se extrajeron con fenol/cloroformo (1:1) y cloroformo las mezclas de replicación estándar de 10 μ l que contenían la polimerasa P2 o el tampón de control P2 y carecían de nucleótidos marcados, se llevaron a 2,5 M de NH₄OAc y se precipitaron con etanol. Los sedimentos de ARN se disolvieron en agua estéril, se calentaron a 100°C durante 3 min, se enfriaron en hielo durante otros 3 min, y se transfirieron hasta temperatura ambiente. Las muestras de ARN se mezclaron con el resto de los componentes del análisis y las mezclas se incubaron a 42°C durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 7,5 μ l de formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,05% y xileno cianol FF al 0,05%. Las mezclas detenidas se incubaron a

continuación a 80°C durante 5 min y se analizaron en una PAAG al 6% que contenía urea 7,5 M.

(b) Se diseñó un experimento cinético para determinar la velocidad de elongación de la polimerasa P2 replicante. La replicación de los transcritos naturales de $\phi 6$ se inició mediante la adición de proteína P2 a la mezcla, y se tomaron alícuotas en diferentes puntos de tiempo para el análisis electroforético posterior. Tal como resulta evidente a partir del autorradiograma mostrado en la figura 6A, el producto S de longitud completa apareció en primer lugar después de un periodo de retraso corto, seguido sucesivamente por M y L. A continuación, las intensidades de banda se incrementaron, como mínimo, hasta el punto de 1 h (3600 s). La acumulación de ARN de doble cadena individual con el tiempo también se representó como curvas de evolución con el tiempo (figuras 6 B-D). Extrapolando las fases lineales de las curvas al eje de tiempo, se obtienen tiempos característicos necesarios para la síntesis completa de cada producto de doble cadena. Suponiendo un inicio uniforme en las tres muestras de ARN de cadena simple, la velocidad de elongación promedio (V_{av}) se puede calcular como:

$$V_{av} = [(L-M)/(\tau_L - \tau_M) + (M-S)/(\tau_M - \tau_S) + (L-S)/(\tau_L - \tau_S)]/3,$$

en la que L, M y S son las longitudes de los correspondientes segmentos (S=2948 pb, M=4063 pb y L=6374 pb; McGraw y otros, 1986; Gottlieb y otros, 1988; Mindich y otros, 1988); τ_L , τ_M y τ_S son los tiempos característicos observados (figuras 6B-D). Consecuentemente, la velocidad de elongación de P2 bajo condiciones de análisis fue de aproximadamente 120 pb/s.

EJEMPLO 3

Síntesis de ARN en las mezclas de reacción programadas con sustratos de ARN de doble cadena, ADN de cadena simple y ADN de doble cadena

Preparaciones de ácido nucleico

Se prepararon sustratos de ARN de doble cadena mediante extracción con fenol-cloroformo de los virus con ARN de doble cadena purificados (bacteriófago $\phi 6$, BTV, CPV, virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae*). El ARN se precipitó con etanol y se disolvió en agua estéril. Se tomaron grandes precauciones en el caso de BTV y CPV para asegurar que la preparación de ARN no contenía partículas virales infecciosas. Se prepararon sustratos de ADN de cadena simple lineal corto (desoxirribonucleótidos)

mediante síntesis química. Específicamente, en este ejemplo se utilizaron los oligonucleótidos:

5'-CGTTCAGTTCTCAGTTCT-3' (SEC ID NO: 5);

5'-GGTAAGCGCCATATGCCGAGGAGA-3' (SEC ID NO: 6); y

5'-CTGAATTCTAATACGACTCACTATAGATCCGACCGTAG-3' (SEC ID NO: 7)

También se utilizó ADN de cadena simple largo de un bacteriófago M13 recombinante (M13mp10, Amersham) linealizado con la endonucleasa de restricción *HinfI* como sustrato para la síntesis de ARN. Los sustratos de ADN de doble cadena lineal se prepararon mediante el corte del ADN circular del plásmido pUC 18 con las diferentes endonucleasas de restricción: *BamHI*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SmaI* y *XbaI*. La incubación con una enzima de restricción se siguió siempre de una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Las concentraciones de tanto el ARN de doble cadena como el ADN se midieron mediante la densidad óptica a 260 nm. La calidad de las preparaciones de ácido nucleico se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Pagratis y Revel, 1990) o geles de poliacrilamida que contenían urea 7,5 M.

Análisis de la síntesis de ARN

El análisis se realizó esencialmente tal como se ha descrito en el ejemplo 2 con la única excepción de que se añadió a la mezcla de reacción 40-300 µg/ml de un sustrato de ARN de doble cadena, o 40-100 µg/ml de un sustrato de ADN de cadena simple, o 100 µg/ml de un sustrato de ADN de doble cadena, en lugar de ARN de cadena simple. La mezcla que contenía un sustrato de ácido nucleico, la polimerasa P2 y todos los aditivos requeridos se incubó habitualmente a 28°C durante 1 hora y los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en geles normales (figura 8, figura 9A, figura 10) o geles para la separación de cadenas (figura 9B) realizada tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Después de la electroforesis, los geles se secaron y se expusieron con una película Fuji Super RX. La polimerasa P2 sintetiza ARN en presencia de varias plantillas de ARN de doble cadena (figura 8). De manera destacada, las cadenas de ARN de cadena positiva son los productos principales de la síntesis de ARN sobre ARN de doble cadena de $\phi 6$ (figura 9). Esto recuerda la situación con la transcripción de $\phi 6$ *in vivo*. La incubación del ADN de cadena simple lineal del bacteriófago M13 en presencia de la

polimerasa P2 (figura 10A, carril N) produce un producto de reacción que migra como una muestra de ácido nucleico de doble cadena del tamaño correspondiente (aproximadamente 7 kb). No aparece ningún producto marcado en las reacciones de control sin P2 (figura 10A, carril N) o sólo contenían UTP en lugar de la mezcla de los cuatro nucleósido trifosfatos (no mostrado). Estos datos sugieren firmemente que el producto aparece como una doble cadena del ADN plantilla y la cadena de ARN recién sintetizada. De manera análoga, también se ha demostrado la formación de las dobles cadenas de ADN-ARN marcadas cuando la mezcla de reacción se programó con desoxirribooligonucleótidos sintéticos cortos (no mostrado). De este modo, la síntesis de ARN catalizada por P2 sobre plantillas de ADN de cadena simple recuerda muy probablemente la reacción con plantillas de ARN de cadena simple. La incubación de algunas plantillas de ADN de doble cadena lineal con P2 da lugar a la aparición de formas de ácido nucleico marcadas migradas como los ADN de doble cadena de entrada (figura 10B). De manera destacada, la eficacia de la síntesis de ARN depende de la naturaleza de los extremos del ADN de doble cadena. El ADN de pUC18 cortado con *Bam*HI, *Hin*III, *Pst*I, *Sac*I, *Sma*I o *Xba*I estimuló la incorporación detectable del nucleótido marcado, mientras que el mismo ADN cortado con *Hinc*II o *Kpn*I no lo hizo. No se detectó producto marcado en las reacciones de control sin P2 o contenían sólo UTP en lugar de la mezcla de los cuatro nucleósido trifosfatos. Se puede proponer que la reacción sobre las plantillas de ADN de doble cadena recuerda la transcripción del ARN de doble cadena.

Referencias citadas

- Axelrod, V.D. y Kramer, F.R. (1985) Transcription from bacteriophage T7 and SP6 RNA polymerase promoters in the presence of 3'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate chain terminators. *Biochemistry*, 24, 5716-5723.
- Bamford, D.H., Ojala, P.M, Frilander, M., Walin, L. y Bamford, J.K.H. (1995) Isolation, purification, and function of assembly intermediates and subviral particles of bacteriophages PRD1 and ϕ 6. En Adolph, K. W: (ed.) *Methods in Molecular Genetics*, vol. 6, Academic Press, págs. 455-474.
- Blumenthal, T. (1980) Q β replicase template specificity: different templates require different GTP concentrations for initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2601-2605.

- Bruenn, J.A. (1991) Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 19, 217-226.
- Bruenn, J.A. (1993) A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Res.*, 21, 5667-5669.
- Brewer, G., Murray, E. y Staeben, M. (1992) RNase ONE: Advantages for nuclease protection assays. *Promega Notes Magazine*, 38, 1-7.
- Butcher, S.J., Dokland, T., Ojala, P.M., Bamford, D.H. y Fuller, S.D. (1997) Intermediates in the assembly pathway of the double-stranded RNA virus $\phi 6$. *EMBO J.*, 16, 4477-4487.
- Casini, G., Qiao, X. y Mindich, L. (1994) Reconstitution of active replicase in procapsids of the segmented dsRNA bacteriophage $\phi 6$. *Virology*, 204, 251-253.
- Cohen, J. (1975) Ribonucleic acid polymerase activity in purified infectious pancreatic necrosis virus of trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 689-695.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher, D.C. (1994) green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-805.
- Chen, D., Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Gorziglia, M., Estes, M.K. y Ramig, R.F. (1994) Template-dependent, *in vitro* replication of rotavirus RNA. *J. Virol.*, 68, 7030-7039.
- de Haas, F., Paatero, A.O., Mindich, L., Bamford, D.H. y Fuller, S.D. (1999) A symmetry mismatch at the site of RNA packaging in the polymerase complex of dsRNA bacteriophage $\phi 6$. *J. Mol. Biol.*, 294, 357-372.
- Dreher, T.W. y Hall, T.C. (1988) Mutational analysis of the sequence and structural requirements in brome mosaic virus RNA for minus strand promoter activity. *J. Mol. Biol.*, 201, 31-40.
- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
- Fields, B.N. y Knipe, D.M. (1990) *Fields Virology*, Second Edition. Raven Press, New York.
- Frilander, M., Gottlieb, P., Strassman, J., Bamford, D.H. y Mindich, L. (1992) Dependence of minus-strand synthesis on

complete genomic packaging in the double-stranded RNA bacteriophage $\phi 6$. *J. Virol.*, 66, 5013-5017.

Frilander, M. y Bamford, D.H. (1995) *In vitro* packaging of the single-stranded RNA genomic precursors of the segmented double-stranded RNA bacteriophage $\phi 6$: the three segments modulate each other's packaging efficiency. *J. Mol. Biol.*, 246, 418-428.

Fujimura, T., Esteban, R. y Wickner, R.B. (1986) *In vitro* L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4433-4437.

Fujimura, T. y Wickner, R.B. (1988) Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *In vitro* conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form. *J. Biol. Chem.*, 263, 454-460.

Fujimura, T. y Wickner, R.B. (1989) Reconstitution of template-dependent *in vitro* transcriptase activity of a yeast double-stranded RNA virus. *J. Biol. Chem.*, 264, 10872-10877.

Gottlieb, P., Metzger, S., Romantschuk, M., Carton, J., Strassman, J., Bamford, D.H., Kalkkinen, N. y Mindich, L. (1988) Nucleotide sequence of the middle dsRNA segment of bacteriophage $\phi 6$: placement of the genes of membrane-associated proteins. *Virology*, 163, 183-190.

Gottlieb, P., Strassman, J., Qiao, X.Y., Frucht, A. y Mindich, L. (1990) *In vitro* replication, packaging, and transcription of the segmented double-stranded RNA genome of bacteriophage $\phi 6$: studies with procapsids assembled from plasmid-encoded proteins. *J. Bacteriol.*, 172, 5774-5782.

Gottlieb, P., Strassman, J. y Mindich, L. (1992a) Protein P4 of the bacteriophage $\phi 6$ procapsid has a nucleoside triphosphate-binding site with associated nucleoside triphosphate phosphohydrolase activity. *J. Virol.*, 66, 6220-6222.

Gottlieb, P., Strassman, J., Qiao, X., Frilander, M., Frucht, A. y Mindich, L. (1992b) *In vitro* packaging and replication of individual genomic segments of bacteriophage $\phi 6$ RNA. *J. Virol.*, 66, 2611-2616.

- Herring, A.J. y Bevan, E.A. (1977) Yeast virus-like particles possess a capsid-associated single-stranded RNA polymerase. *Nature (London)*, 268, 464-466.
- Joklik, W.K. (1974) Reproduction of the reoviridae. En Fraenkel-Conrat, H. y Wagner, R.R. (eds) *Comprehensive Virology*, vol. 2, Plenum Press, New York, págs. 231-334.
- Juuti, J.T. y Bamford, D.H. (1995) RNA binding, packaging and polymerase activities of the different incomplete polymerase complex particles of dsRNA bacteriophage $\phi 6$. *J. Mol. Biol.*, 249, 545-554.
- Juuti, J.T. y Bamford, D.H. (1997) Protein P7 of phage $\phi 6$ RNA polymerase complex, acquiring of RNA packaging activity by *in vitro* assembly of the purified protein onto deficient particles. *J. Mol. Biol.*, 266, 89 1-900.
- Juuti, J.T., Bamford, D.H., Tuma, R. y Thomas, G.J.Jr (1998) Structure and NTPase activity of the RNA-translocating protein (P4) of bacteriophage $\phi 6$. *J. Mol. Biol.*, 279, 347-359.
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E. y Chumakov, K.M. (1989) Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. *FEBS Lett.*, 252, 42-46.
- Macreadie, I.G. y Azad, A.A. (1993) Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein in bacteria and yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 30, 1169-1178.
- Makeyev, E.V., Kolb, V.A. y Spirin, A.S. (1996) Enzymatic activity of the ribosome-bound nascent polypeptide. *FEBS Lett.*, 378, 166-170.
- McGraw, T., Mindich, L. y Frangione, B. (1986) Nucleotide sequence of the small double-stranded RNA segment of bacteriophage $\phi 6$: novel mechanism of natural translational control. *J. Virol.*, 58, 142-151.
- Mindich, L., Nemhauser, I., Gottlieb, P., Romantschuk, M., Carton, J., Frucht, S., Strassman, J., Bamford, D.H. y Kalkkinen, N. (1988) Nucleotide sequence of the large double-stranded RNA segment of bacteriophage $\phi 6$: genes specifying the viral replicase and transcriptase. *J. Virol.*, 62, 1180-1185.

- Mindich, L., Qiao, X., Onodera, S., Gottlieb, P. y Frilander, M. (1994) RNA structural requirements for stability and minus-strand synthesis of in the dsRNA bacteriophage $\phi 6$. *Virology*, 202, 258-263.
- Mindich, L., Qiao, X., Qiao, J., Onodera, S., Romantschuk, M. y Hoogstraten, D. (1999) Isolation of additional bacteriophages with genomes of segmented double-stranded RNA. *J. Bacteriol.*, 181, 4505-4508.
- Olkkonen, V.M. y Bamford, D.H. (1989) Quantitation of the adsorption and penetration stages of bacteriophage $\phi 6$ infection. *Virology*, 171, 229-238.
- Olkkonen, V.M., Gottlieb, P., Strassman, J., Qiao, X.Y., Bamford, D.H. y Mindich, L. (1990) *In vitro* assembly of infectious nucleocapsids of bacteriophage $\phi 6$: Formation of a recombinant double-stranded RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9173-9177.
- Paatero, A.O., Syvaaja, J.E. y Bamford, D.H. (1995) Double-stranded RNA bacteriophage $\phi 6$ protein P4 is an unspecific nucleoside triphosphatase activated by calcium ions. *J. Virol.*, 69, 6729-6734.
- Paatero, A.O., Mindich, L. y Bamford, D.H. (1998) Mutational analysis of the role of nucleoside triphosphatase P4 in the assembly of the RNA polymerase complex of bacteriophage $\phi 6$. *J. Virol.*, 72, 10058-10065.
- Pagratis, N. y Revel, H.R. (1990) Detection of bacteriophage $\phi 6$ minus-strand RNA and novel mRNA isoconformers synthesized *in vivo* and *in vitro*, by strand-separating agarose gels. *Virology*, 177, 273-280.
- Partridge, J.E., Van Etten, J.L., Burbank, D.E. y Vidaver, A.K. (1979) RNA polymerase associated with bacteriophage $\phi 6$ nucleocapsid. *J. Gen. Virol.*, 43, 299-307.
- Patton, J.T. (1996) Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J. Virol.*, 70, 7940-7947.
- Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.W. y Xiaobo, J. (1997) Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.*, 71, 9618-9626.

- Qiao, X., Qiao, J. y Mindich, L. (1997) Stoichiometric packaging of the three genomic segments of double-stranded RNA bacteriophage $\phi 6$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4074-4079.
- Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Semancik, J.S., Vidaver, A.K. y Van Etten, J.L. (1973) Characterization of segmented double-helical RNA from bacteriophage $\phi 6$. J. Mol. Biol., 78, 617-625.
- Sharp, P.A. (1999) RNAi and double-strand RNA. Genes Dev., 13, 139-141.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol., 189, 113-130.
- Urakawa, T., Ritter, D.G. y Roy, P. (1989) Expression of largest RNA segment and synthesis of VP1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: association of VP1 protein with RNA polymerase activity. Nucleic Acids Res., 17, 7395-7401.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vasquez, M., Femandez, J., Hernandez, O., Patton, J. y Spencer, E. (1991) Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. J. Virol., 65, 3964-3967.
- Van Etten, J.L., Vidaver, A.K., Koski, R.K., Semancik, J.S. (1973), RNA polymerase activity associated with bacteriophage $\phi 6$. J. Virol., 12, 464-471.
- Van Etten, J.L., Vidaver, A.K., Koski, R.K. y Bumett, J.P. (1974) Base composition and hybridization studies of the three double-stranded RNA segments of bacteriophage $\phi 6$. J. Virol., 13, 1254-1262.
- Van Dijk, A.A., Frilander, M. y Bamford, D.H. (1995) Differentiation between minus- and plus-strand synthesis: polymerase activity of dsRNA bacteriophage phi 6 in an *in vitro* packaging and replication system. Virology, 211, 320-323.
- Vidaver, A.K., Koski, R.K. y Van Etten, J.L. (1973) Bacteriophage $\phi 6$: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*. J. Virol., 11, 799-805.

Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Cohen, J., Estes, M.K. y Ramig, R.F.
(1996) Characterization and replicase activity of
double-layered and single-layered rotavirus-like particles
expressed from baculovirus recombinants. J. Virol., 70,
2736-2742.

Patente de Estados Unidos 5.173.411

Patente de Estados Unidos 5.614.403

Patente de Estados Unidos 5.631.129

Patente de Estados Unidos 5.795.715

Patente de Estados Unidos 5.854.037

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Makeyev, Eugeny Bamford, Dennis

<120> Proteína polimerasa nueva para la síntesis de ARN y
utilización de la misma

<130> hyl

<140>

<141>

<150> 19992751

<151> 1999-12-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1998

<212> ADN

<213> bacteriófago f6 de Pseudomonas syringae

<400> 1

```

atgccgagga gagctcccgc gttccctctg agcgatatca aggctcagat gctgttcgca 60
aataacatca aggcccaaca agcctcgaag cgtagcttca aagagggggc gattgaaacg 120
tacgaagggc tgctttcagt agaccctcgg tttttgagtt tcaagaacga gctctctcgg 180
tatctgaccg accacttccc ggcgaaacgc gacgagtatg gtcgtgttta tggaaacggg 240
gttcgtacca acttctttgg tatcgccac atgaacgggt ttccaatgat ccccgcgacg 300
tggccactcg cttccaacct taagaaacgt gccgacgctg acctagccga tggccctggt 360
tctgagcgcg acaatctact ctttcgcgcc gcagtcgggc ttatgttttc agatctagag 420
cctgttccgc tgaagatccg taaaggatcg tcaacctgca tcccgtattt ttctaacgat 480
atgggaacga agatcgagat cgccgagcgc gctcttgaga aagcggaaga agctggcaat 540
ctgatgctgc aaggtaagtt tgatgacgcc taccagctcc accaaatggg ttgtgcctat 600
tacgtcgtgt atcgtgcaca atcgaccgat gctatcacac tcgaccctaa gaccggaaaa 660
ttcgtgtcaa aggatcgat ggtcgtgac ttcgaatacg cagtcacggg cggtgagcaa 720
ggctcgtctg tcgctgcttc gaaggatgcc tctcgtttga aggaacagta cgggatagat 780
gtcccggacg ggtttttctg cgagcggcgt cgtaccgcta tgggtgggtcc gtcgcgcttg 840
aacgctccta tcatggcctg tgcgcaacct gtgcgaaaca aaatttactc caagtacgct 900
tacaccttcc accatactac tcgtcttaat aaggagggaaa aggtgaaaga gtggctcgtt 960
tgcgtcgcta ctgacgtatc cgaccacgac acgttctggc ctggatggct gcgggatctc 1020
atctgtgatg aactgctcaa catgggggtac gctccgtggg ggggtaagtt gttcgagacc 1080
tcgctcaaac tgcccgttta cgtgggcgct cctgctcctg agcagggcca cacgttggtg 1140
ggtgatccgt ccaaccctga tctcgaagtt ggtctctcgt ccggacaagg ggcgaccgac 1200
ctcatgggca cgttgctcat gagtatcacc tacctggtga tgcaacttga tcacaccgct 1260
cctcacctca acagtccaat caaggacatg ccatcagcat gccgctttct tgactcgtat 1320
tggcaaggac acgaggagat ccgtcagatc tcaaaatctg atgatgctat gcttggctgg 1380
accaaaggtc gtgctttggg ttgtggtcat cgtttgttcg agatgctgaa agagggtaag 1440
gttaaccctc caccttacct gaagatctcc tacgagcacg gtggcgcctt ccttgggtgac 1500
atcctgcttt acgactcgcg tcgtgagcct ggctctgcca tcttcggttg taacatcaac 1560
tcaatgctga acaaccagtt cagccctgag tacgggtgcc aatcgggcgt tcgcgaccga 1620
tctaagcgca aacggccggt ccccggtctt gcttgggcgt cgatgaaaga tactacggt 1680
gcctgtccga tctactctga tgtgctggag gcgatcgagc gttgctgggtg gaacgcgctc 1740
ggtgactcgt accgtgcgta tcgtgaagat atgcttaaac gcgacactct cgaactatca 1800
cgtaacgctg cgctgatggc tcgtcaagcc gggctggctg aactcactcc cattgatttg 1860
gaggtgcttg ctgacccgaa caaactccag tataagtgga ccgagggcca tgtctcggcg 1920
aatatccacg aggtactgat gcatggcgta tcggtcgaaa agactgagcg ctttctccgt 1980
tctgtaatgc ctaggtaa 1998

```

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 2

ggtaagcgcc atatgcccag gaga 24

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 3

tacgaattcc ggcatgatta cctaggcatt aca 33

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
<400> 4
ggataaaca gtccttgat aac 23
<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
<400> 5
cgttcagttc tcagttct 18
<210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
<400> 6
ggtaagcgcc atatgccgag gaga 24
<210> 7
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
<400> 7
ctgaattcta atacgactca ctatagatcc gaccgtag 38
<210> 8
<211> 665
<212> PRT
<213> bacteriófago f6 de Pseudomonas syringae
<400> 8

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

Asp Arg Met Val Ala Asp Phe Glu Tyr Ala Val Thr Gly Gly Glu Gln
 225 230 235 240
 Gly Ser Leu Phe Ala Ala Ser Lys Asp Ala Ser Arg Leu Lys Glu Gln
 245 250 255
 Tyr Gly Ile Asp Val Pro Asp Gly Phe Phe Cys Glu Arg Arg Arg Thr
 260 265 270
 Ala Met Gly Gly Pro Phe Ala Leu Asn Ala Pro Ile Met Ala Val Ala
 275 280 285
 Gln Pro Val Arg Asn Lys Ile Tyr Ser Lys Tyr Ala Tyr Thr Phe His
 290 295 300
 His Thr Thr Arg Leu Asn Lys Glu Glu Lys Val Lys Glu Trp Ser Leu
 305 310 315 320
 Cys Val Ala Thr Asp Val Ser Asp His Asp Thr Phe Trp Pro Gly Trp
 325 330 335
 Leu Arg Asp Leu Ile Cys Asp Glu Leu Leu Asn Met Gly Tyr Ala Pro
 340 345 350
 Trp Trp Val Lys Leu Phe Glu Thr Ser Leu Lys Leu Pro Val Tyr Val
 355 360 365
 Gly Ala Pro Ala Pro Glu Gln Gly His Thr Leu Leu Gly Asp Pro Ser
 370 375 380
 Asn Pro Asp Leu Glu Val Gly Leu Ser Ser Gly Gln Gly Ala Thr Asp
 385 390 395 400
 Leu Met Gly Thr Leu Leu Met Ser Ile Thr Tyr Leu Val Met Gln Leu
 405 410 415
 Asp His Thr Ala Pro His Leu Asn Ser Arg Ile Lys Asp Met Pro Ser
 420 425 430
 Ala Cys Arg Phe Leu Asp Ser Tyr Trp Gln Gly His Glu Glu Ile Arg
 435 440 445
 Gln Ile Ser Lys Ser Asp Asp Ala Met Leu Gly Trp Thr Lys Gly Arg
 450 455 460
 Ala Leu Val Gly Gly His Arg Leu Phe Glu Met Leu Lys Glu Gly Lys
 465 470 475 480
 Val Asn Pro Ser Pro Tyr Met Lys Ile Ser Tyr Glu His Gly Gly Ala
 485 490 495
 Phe Leu Gly Asp Ile Leu Leu Tyr Asp Ser Arg Arg Glu Pro Gly Ser
 500 505 510
 Ala Ile Phe Val Gly Asn Ile Asn Ser Met Leu Asn Asn Gln Phe Ser
 515 520 525
 Pro Glu Tyr Gly Val Gln Ser Gly Val Arg Asp Arg Ser Lys Arg Lys
 530 535 540

Arg Pro Phe Pro Gly Leu Ala Trp Ala Ser Met Lys Asp Thr Tyr Gly
 545 550 555 560
 Ala Cys Pro Ile Tyr Ser Asp Val Leu Glu Ala Ile Glu Arg Cys Trp
 565 570 575
 Trp Asn Ala Phe Gly Glu Ser Tyr Arg Ala Tyr Arg Glu Asp Met Leu
 580 585 590
 Lys Arg Asp Thr Leu Glu Leu Ser Arg Tyr Val Ala Ser Met Ala Arg
 595 600 605
 Gln Ala Gly Leu Ala Glu Leu Thr Pro Ile Asp Leu Glu Val Leu Ala
 610 615 620
 Asp Pro Asn Lys Leu Gln Tyr Lys Trp Thr Glu Ala Asp Val Ser Ala
 625 630 635 640
 Asn Ile His Glu Val Leu Met His Gly Val Ser Val Glu Lys Thr Glu
 645 650 655
 Arg Phe Leu Arg Ser Val Met Pro Arg
 660 665

REIVINDICACIONES

1. Proteína ARN polimerasa aislada dependiente de ARN, en la que la proteína presenta, en forma aislada sin ayuda de ninguna otra proteína, la capacidad inespecífica e independiente de cebador de sintetizar *in vitro* ARN cuando se pone en contacto con sustratos de ácido nucleico bajo condiciones suficientes, dicha proteína originaria de un virus de la familia de *Cystoviridae* y siendo dicha polimerasa capaz de catalizar la síntesis de ARN en presencia de sustratos de ARN de cadena simple, ARN de doble cadena, ADN de cadena simple y ADN de doble cadena.

2. Proteína, según la reivindicación 1, en la que la proteína se origina de bacteriófagos relacionados con $\phi 6$.

3. Proteína, según la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína se origina de $\phi 6$, $\phi 7$, $\phi 8$, $\phi 9$, $\phi 10$, $\phi 11$, $\phi 12$, $\phi 13$ o $\phi 14$.

4. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína es P2 o una forma alterada o modificada genéticamente de P2, que presenta en forma aislada sin ayuda de ninguna otra proteína la capacidad inespecífica e independiente de cebador de sintetizar *in vitro* ARN.

5. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, seleccionada del grupo que comprende:

- a) una proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 1;
- b) una proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8; y
- c) una secuencia de aminoácidos que muestra, como mínimo, el 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8.

6. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8.

7. Método para la producción de la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar células huésped que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en un medio de cultivo para expresar dicha proteína en forma soluble;

- (b) recuperar la proteína del huésped o del medio de cultivo;
- (c) purificar y aislar la proteína de otras proteínas; y opcionalmente
- (d) analizar la actividad de síntesis por el ARN de dicha proteína.

8. Método para el aislamiento y purificación de la proteína, según la reivindicación 7, en el que el método comprende las etapas adicionales de:

- a) romper las células huésped en un tampón para obtener un lisado celular;
- b) aclarar dicho lisado mediante centrifugación;
- c) purificar la proteína utilizando, como mínimo, una etapa, más preferentemente dos etapas de cromatografía de afinidad;
- d) purificar adicionalmente la proteína utilizando, como mínimo, una etapa de cromatografía de intercambio iónico para obtener una fracción que está esencialmente libre de actividades nucleasa y proteasa.

9. Método para la producción *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de:

- proporcionar un sustrato de ARN de cadena simple o ARN de doble cadena;
- poner en contacto dicho sustrato de ARN de cadena simple o ARN de doble cadena con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN; y
- recuperar de la mezcla de reacción la muestra de ARN recién producida.

10. Método, según la reivindicación 9, en el que dicha muestra de ARN recién producida es ARN de doble cadena.

11. Método, según la reivindicación 9 ó 10, que comprende las siguientes etapas para la amplificación *in vitro* de ARN:

- (a) proporcionar dicho sustrato de ARN;
- (b) poner en contacto dicho sustrato de ARN con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada bajo condiciones suficientes tanto para la replicación de ARN como para la transcripción de ARN; y
- (c) recuperar de la mezcla de reacción una mezcla de ARN amplificado recién producido.

12. Método, según la reivindicación 11, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un sustrato de ARN de cadena simple;
- (b) replicar dicho sustrato de ARN de cadena simple con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en forma aislada para formar ARN de doble cadena;
- (c) transcribir dicho ARN de doble cadena con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para obtener ARN de cadena simple; y
- (d) repetir las etapas de amplificación hasta haber obtenido una cantidad suficiente de productos de síntesis de ARN.

13. Método, según la reivindicación 9 ó 10, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un sustrato de ARN de cadena simple mediante la transcripción de una plantilla de ADN con una ARN polimerasa dependiente de ADN; y
- (b) replicar dicho sustrato de ARN de cadena simple con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada para formar ARN de doble cadena.

14. Método, según la reivindicación 13, que comprende además las siguientes etapas para la amplificación *in vitro* de ARN:

- (c) transcribir dicho ARN de doble cadena con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada para obtener ARN de cadena simple; y
- (d) repetir las etapas de amplificación hasta haber obtenido una cantidad suficiente de productos de síntesis de ARN.

15. Método, según la reivindicación 13 ó 14, en el que dicha ARN polimerasa dependiente de ADN deriva de un bacteriófago, preferentemente seleccionado del grupo que comprende los bacteriófagos T7, T3, y SP6.

16. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo de manera simultánea o secuencial en el mismo recipiente de reacción.

17. Método para la estabilización de ácidos nucleicos, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un sustrato de ácido nucleico de cadena simple;
- (b) poner en contacto dicho sustrato de ácido nucleico de cadena simple con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada bajo condiciones

suficientes para la síntesis de ARN a efectos de convertir, como mínimo, parte del sustrato de ácido nucleico de cadena simple en la forma de ácido nucleico de doble cadena;

(c) recuperar los ácidos nucleicos totales de la mezcla de reacción; y

(d) poner en contacto dichos ácidos nucleicos totales con una preparación que contiene una nucleasa o nucleasas que degradan de manera selectiva los ácidos nucleicos de cadena simple, pero no los ácidos nucleicos de doble cadena; y

(e) recuperar los ácidos nucleicos de doble cadena que muestran una mayor estabilidad a la degradación por nucleasas.

18. Método para la producción *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de.

(a) proporcionar un sustrato de ADN de cadena simple o ADN de doble cadena;

(b) poner en contacto dicho sustrato de ADN de cadena simple o ADN de doble cadena con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN; y

(c) recuperar de la mezcla de reacción las muestras de ácido nucleico recién producido.

19. Método, según la reivindicación 18, en el que la muestra de ácido nucleico recién producido comprende dobles cadenas que comprenden réplicas de plantillas de ADN y ARN.

20. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19, en el que el sustrato de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena es lineal.

21. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20, en el que la mezcla para la síntesis de ARN contiene, como mínimo, un nucleósido trifosfato marcado con un isótopo radioactivo o está modificado químicamente.

22. Método para la producción *in vitro* de ARN, que comprende las etapas de:

- proporcionar un sustrato de ARN o ADN;

- poner en contacto dicho sustrato de ARN o ADN con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN en una mezcla que comprende: un sustrato de ácido nucleico, proteína, según cualquiera de las reivindicaciones

1 a 6, nucleósido trifosfatos y opcionalmente tampón, acetato de amonio, DTT, PEG, iones Mg^{2+} , iones Mn^{2+} y/o BSA; y

- incubar la mezcla de reacción a una temperatura suficiente para la síntesis de ARN;

- recuperar de la mezcla de reacción la muestra de ácido nucleico recién producido.

23. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 22, en el que la síntesis de ARN se inicia desde el extremo 3' de un cebador complementario al sustrato de ácido nucleico.

24. Método, según la reivindicación 23, en el que dicho cebador es ARN o ADN de cadena simple.

25. Kit para la producción *in vitro* de ARN, que comprende:

(a) una proteína polimerasa, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada; y opcionalmente

(b) aditivos necesarios para un nivel detectable de síntesis de ARN.

26. Kit, según la reivindicación 25, que comprende nucleósido trifosfatos en concentraciones suficientes para la síntesis de ARN.

27. Kit, según la reivindicación 25 ó 26, en el que, como mínimo, un nucleósido trifosfato está marcado con un isótopo radioactivo o está químicamente modificado.

28. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que el kit contiene adicionalmente una preparación (o preparaciones) estándar de ácido nucleico con capacidad caracterizada por actuar como plantilla (plantillas) para la síntesis de ARN.

29. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, utilizado específicamente para la secuenciación de una molécula de ácido nucleico y que comprende, opcionalmente, como mínimo, un agente terminador de la síntesis de ARN que termina la síntesis de ARN en una base nucleotídica específica.

30. Kit, según la reivindicación 29, en el que dicho agente de terminación de la síntesis de ARN es un 3'-desoxinucleósido trifosfato o un derivado funcional del mismo.

31. Método para la determinación de la secuencia de bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico lineal, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una molécula de ácido nucleico lineal;

(b) incubar dicha molécula de ácido nucleico bajo condiciones suficientes para la síntesis de ARN en una mezcla que comprende:

- una proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma aislada;
- cuatro nucleósido trifosfatos o análogos funcionales de los mismos; y
- como mínimo, uno de los cuatro agentes terminadores de la síntesis de ARN que terminan la síntesis de ARN en una base nucleotídica específica, en el que dicho agente termina la síntesis de ARN en una base nucleotídica diferente; y

(c) separar los productos de ARN terminados de la reacción de incubación según su tamaño, mediante lo cual, se puede determinar, como mínimo, una parte de la secuencia de bases nucleotídicas de dicha molécula de ácido nucleico.

32. Método, según la reivindicación 31, en el que dicha molécula de ácido nucleico es ARN o ADN de cadena simple.

33. Método, según la reivindicación 31, en el que dicha molécula de ácido nucleico es ARN o ADN de doble cadena.

34. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, que comprende la utilización, como mínimo, de uno de dichos nucleósido trifosfatos o análogos funcionales de los mismos modificados para contener un marcador detectable.

35. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, que comprende la utilización, como mínimo, de uno de dichos agentes terminadores de la síntesis de ARN modificado para contener un marcador detectable.

36. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, en el que dichos agentes terminadores de la síntesis de ARN son 3'-desoxinucleósido trifosfatos o derivados funcionales de los mismos.

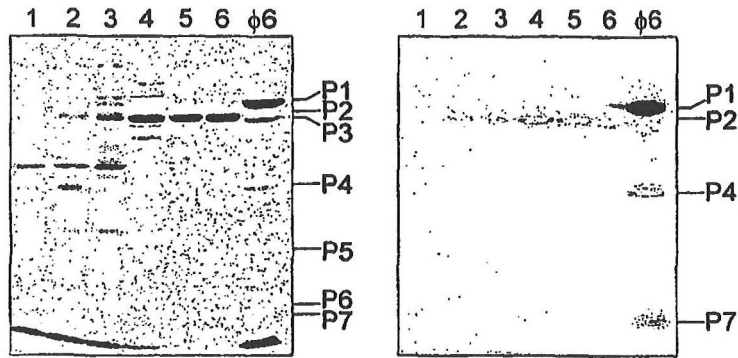


Fig. 1A

Fig. 1B

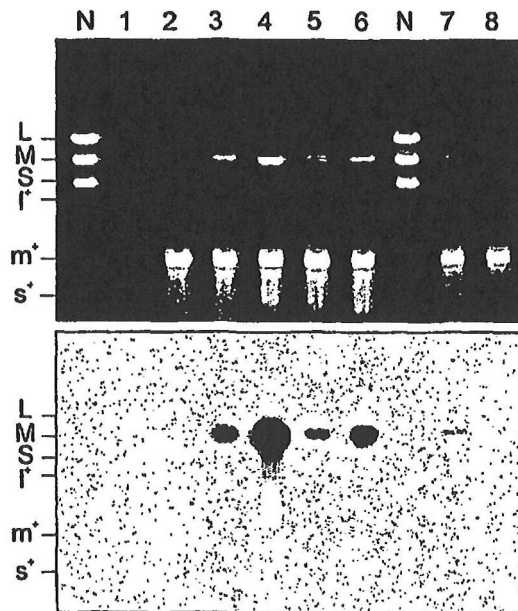


Fig. 2A

Fig. 2B

m ⁺ RNA, pmol	-	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
P2, pmol	15	-	1.5	15	15	15	-	-
P2-CBA, μl	-	-	-	-	-	-	0.1	-
mock-CBA, μl	-	-	-	-	-	-	-	0.1
(A,G)TP, mM	1	1	1	1	1	0.2	1	1
MnCl ₂ , mM	1	1	1	1	-	1	1	1

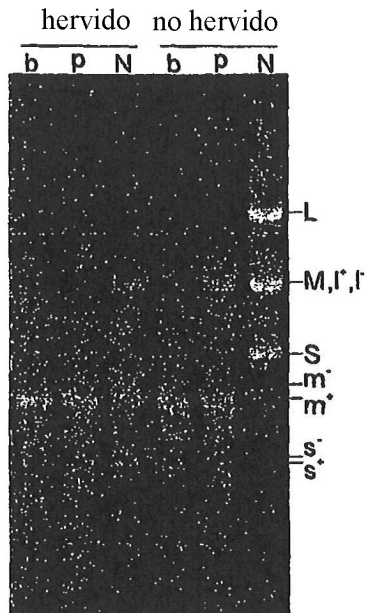


Fig. 3A

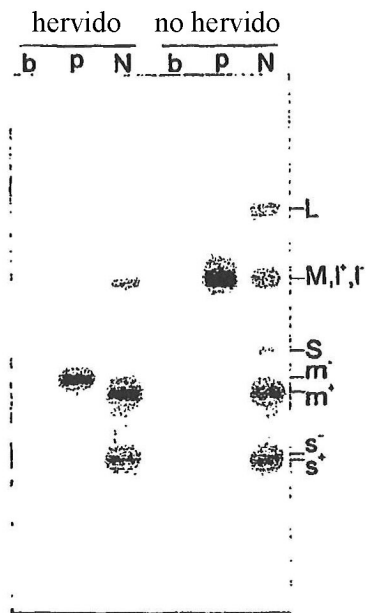


Fig. 3B

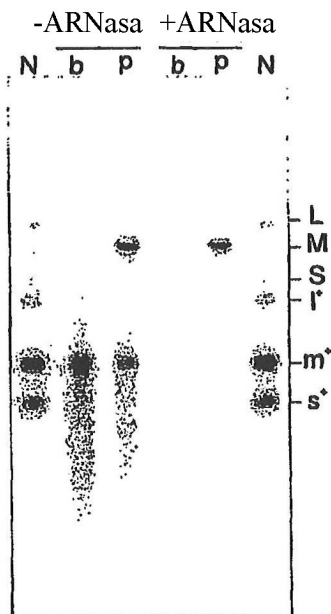


Fig. 3C

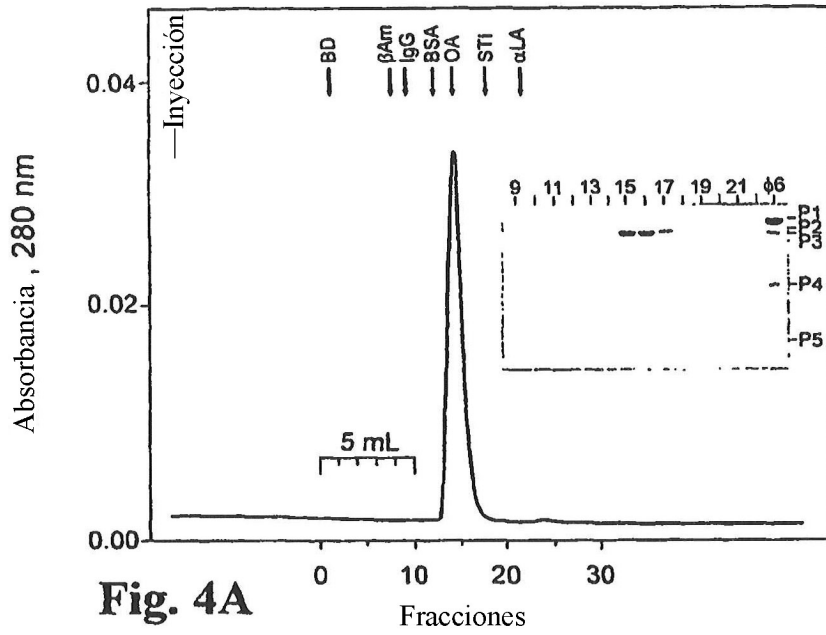


Fig. 4A

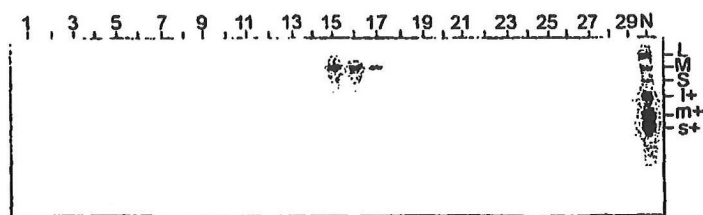


Fig. 4B

Fig. 5A

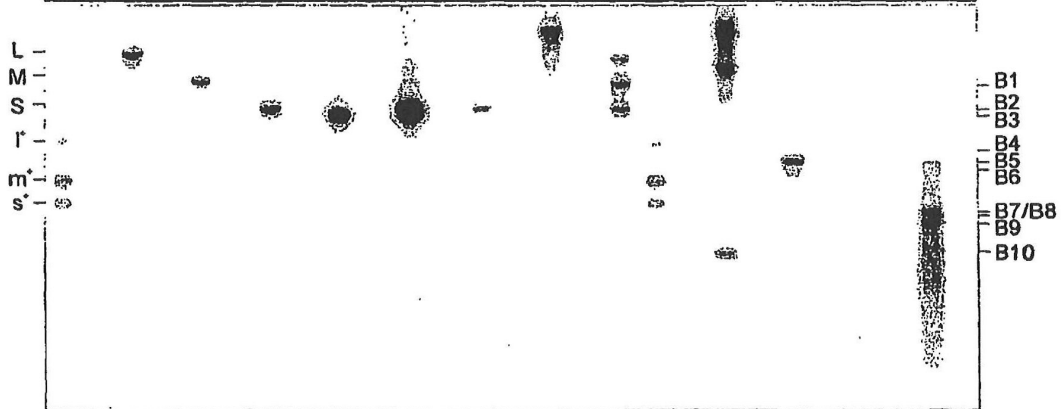
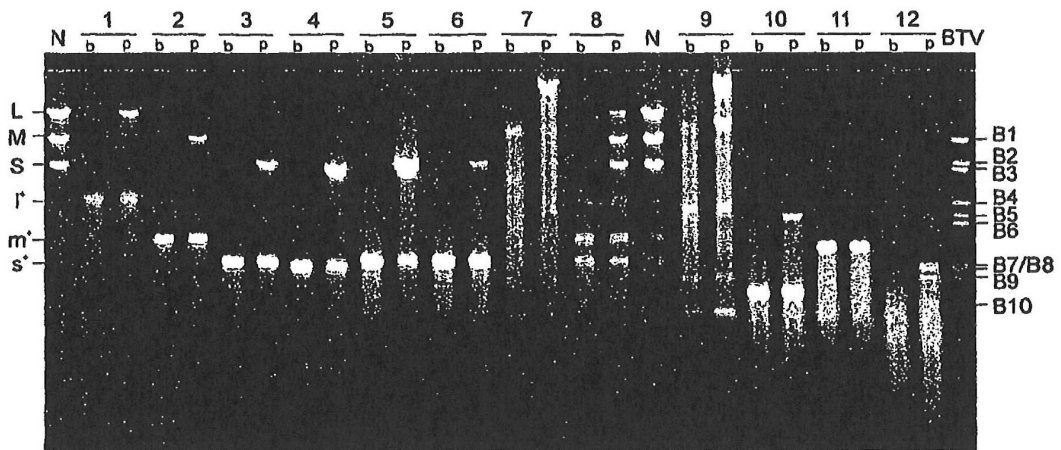


Fig. 5B

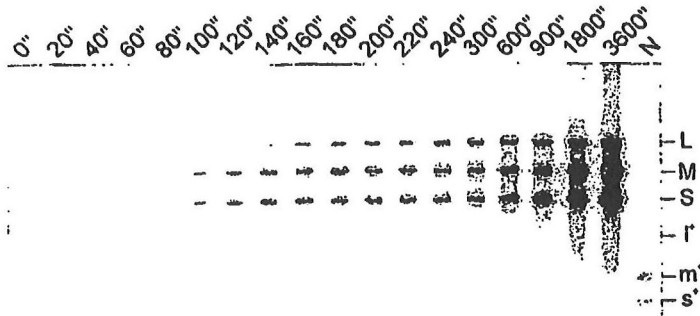


Fig. 6A

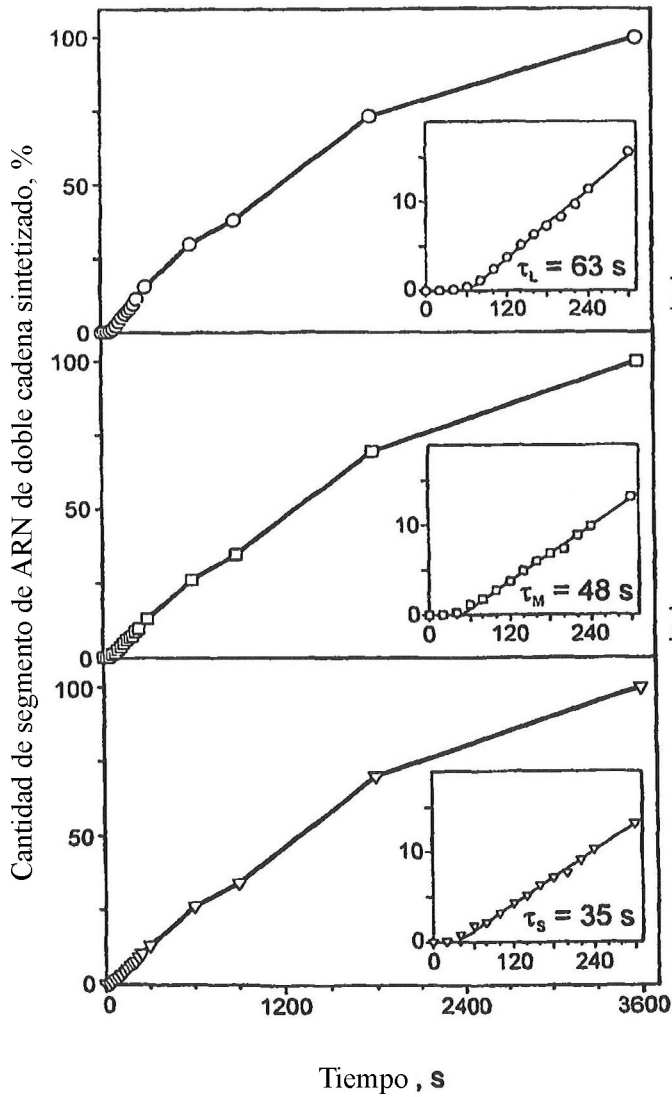


Fig. 6B

Fig. 6C

Fig. 6D

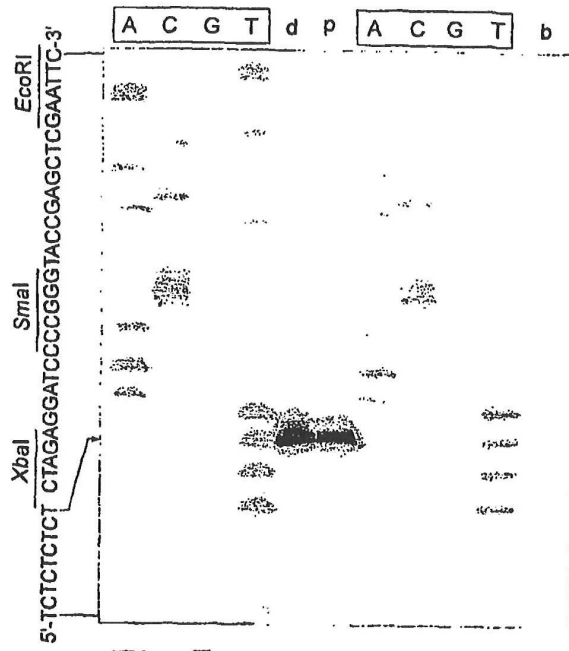


Fig. 7

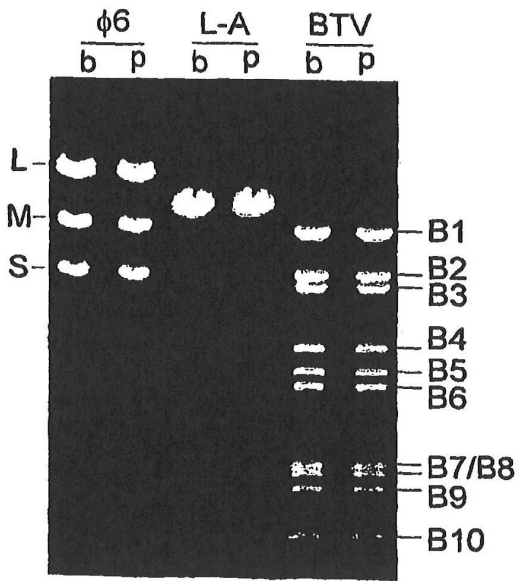


Fig. 8A

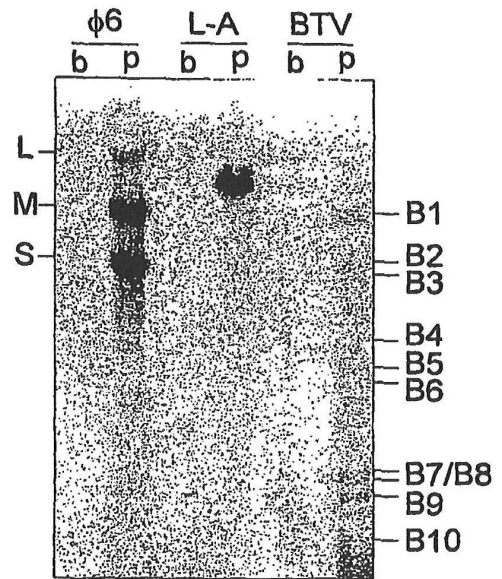


Fig. 8B

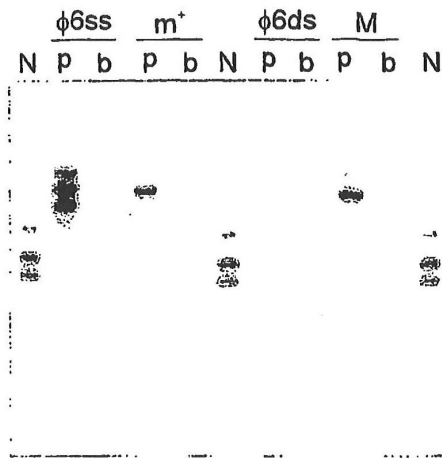


Fig. 9A

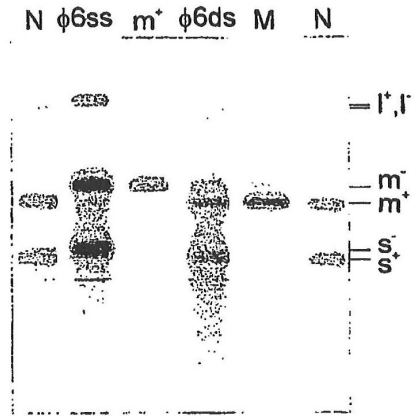


Fig. 9B

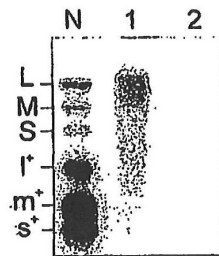


Fig. 10A

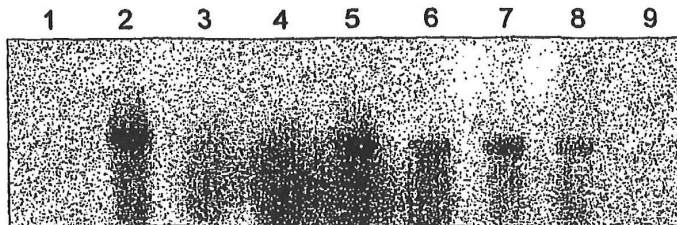


Fig. 10B

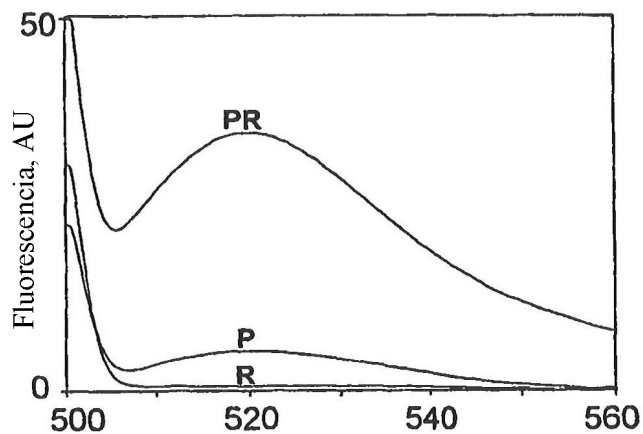


Fig. 11A Longitud de onda, nm

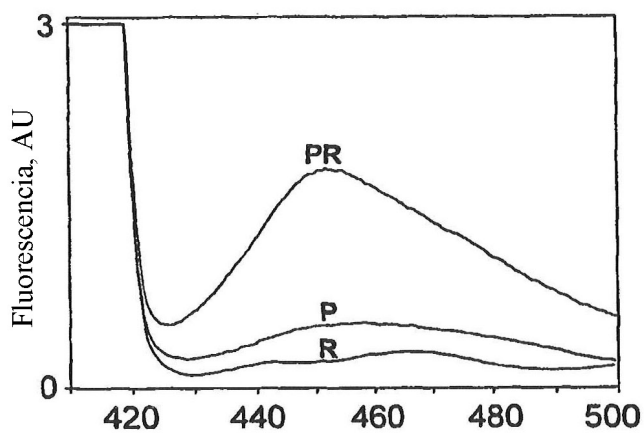


Fig. 11B Longitud de onda, nm



Fig. 11C