



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 189**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 15/54** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 9/22** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00969312 .8**

86 Fecha de presentación : **27.09.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1144653**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54

Título: **Enzima termoestable que promueve la fidelidad de las polimerasas de DNA termoestables para la mejora de la síntesis y amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*.**

30

Prioridad: **28.09.1999 EP 99119268**

73

Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, DE**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2007**

72

Inventor/es: **Ankenbauer, Waltraud;  
Laue, Frank;  
Sobek, Harald y  
Greif, Michael**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2007**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 269 189 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

Enzima termoestable que promueve la fidelidad de las polimerasas de DNA termoestables para la mejora de la síntesis y amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*.

La presente invención está relacionada con el campo de la biología molecular, y más concretamente, con la síntesis de polinucleótidos. La presente invención también está relacionada con una exonucleasa termoestable sustancialmente pura, el clonaje y expresión de una exonucleasa termoestable III en *E. coli*, y su utilización en reacciones de amplificación. La invención facilita la amplificación de DNA con una elevada fidelidad en condiciones que permiten eliminar la contaminación cruzada y la síntesis de productos largos. La invención puede utilizarse para una serie de propósitos industriales, médicos y forenses.

La síntesis *in vitro* de ácido nucleico se realiza de forma rutinaria con polimerasas de DNA con o sin polipéptidos adicionales. Las polimerasas de DNA son una familia de enzimas involucradas en la replicación y reparación del DNA. Se han realizado investigaciones extensivas en el aislamiento de polimerasas de DNA a partir de microorganismos mesófilos como *E. coli*. Véase, por ejemplo, Bessman *et al.*, (1957) *J. Biol. Chem.* **223**:171-177, y Buttin y Kornberg, (1966) *J. Biol. Chem.* **241**:5419-5427.

También se han realizado investigaciones sobre el aislamiento y purificación de polimerasas de DNA a partir de termófilos, como *Thermus aquaticus*. Chien A. *et al.*, (1976) *J. Bacteriol.* **127**:1550-1557 describe el aislamiento y purificación de una polimerasa de DNA con una temperatura óptima de 80°C a partir de la cepa *Thermus aquaticus* YT1. La patente estadounidense N° 4.889.818 describe una polimerasa de DNA termoestable purificada a partir de *T. aquaticus*, la polimerasa Taq, con un peso molecular de entre alrededor de 86.000 y 90.000 daltons. Además, la Solicitud de Patente europea 0 258 017 describe la polimerasa Taq como la enzima preferida para su uso e el proceso de PCR.

Las investigaciones indican que mientras la polimerasa de DNA Taq tiene una función exonucleasa dependiente de polimerasa 5'-3', la polimerasa de DNA Taqno posee una función exonucleasa III 3'-5' (Lawyer F.C. *et al.*, (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**:6427-6437; Bernad A, *et al.* (1989) *Cell* **59**:219). La actividad exonucleasa 3'-5' de las polimerasas de DNA se denomina típicamente "actividad de corrección de pruebas". La actividad exonucleasa 3'-5' elimina bases que no están bien emparejadas en el extremo 3' de un dúplex cebador-molde. La presencia de actividad exonucleasa 3'-5' puede ser ventajosa ya que da lugar a un aumento de la fidelidad de la replicación de las cadenas de ácido nucleico y la elongación de productos terminados prematuramente. Como la polimerasa de DNA Taqno es capaz de eliminar los extremos de cebador mal emparejados tiende a cometer errores de incorporación de bases, haciendo que su uso en ciertas aplicaciones no es adecuado. Por ejemplo, intentar clonar un gen amplificado es problemático ya que cualquier copia del gen puede contener un error debido a un suceso de incorporación errónea al azar. En función del ciclo en el que aparece este error (por ejemplo, en un ciclo de replicación temprano), todo el DNA amplificado podría contener la base incorporada erróneamente, dando lugar así a un producto génico mutado.

Hay varias polimerasas de DNA termoestables conocidas en la materia que muestran actividad exonucleasa 3'-5', como las polimerasas tipo B de las arqueobacterias termófilas que se utilizan para la amplificación de DNA con una elevada fidelidad. Las polimerasas termoestables que muestran actividad exonucleasa 3'-5' pueden aislarse o clonarse a partir de *Pyrococcus* (Polimerasa de DNA termoestable purificada de *Pyrococcus furiosus*, Mathur E., Stratagene, WO 92/09689, US 5.545.552; Polimerasa de DNA termoestable purificada a partir de especies de *Pyrococcus*, Comb D.G. *et al.*, New England Biolabs Inc., PE 0 547 359; Organización y secuencia nucleotídica del gen de la polimerasa de DNA a partir de la arqueobacteria *Pyrococcus furiosus*, Uemori T. *et al.* (1993) *Nucl. Acids Res.*, **21**:259-265.), a partir de especies de *Pyrodictium* (Polimerasa de ácido nucleico termoestable, Gelfand D.H., F. Hoffmann-La Roche AG, PE 0 624 641; Polimerasa de ácido nucleico termoestable purificada y secuencias de DNA codificantes de especies de *Pyrodictium*, Gelfand D.H., Hoffmann-La Roche Inc., US 5.491.086), a partir de *Thermococcus* (por ejemplo la polimerasa de DNA termoestable de especies de *Thermococcus*, TY, Niehaus F., *et al.*, WO 97/35988; Polimerasa de DNA purificada de *Thermococcus barossii*, Luhm R.A., Pharmacia Biotech Inc., WO 96/22389; Polimerasa de DNA de *Thermococcus barossii* con actividad exonucleasa intermedia y mejor estabilidad a largo plazo a temperaturas elevadas, útil en la secuenciación de DNA, PCR, etc., Dhennezel O.B., Pharmacia Biotech Inc., WO 96/22389; Una polimerasa de DNA termoestable purificada a partir de *Thermococcus litoralis* para su utilización en manipulaciones de DNA, Comb D.G., New England Biolabs, Inc., US 5.322.785, PE 0 455 430; Polimerasas de DNA termoestable recombinante a partir de arqueobacterias, Comb D.G., New England Biolabs, Inc., US 5.352.778, PE 0 547 920, PE 0 701 000; Nueva polimerasa de DNA termoestable aislada obtenida a partir de *Thermococcus gorgonarius*, Angerer B. *et al.* Boehringer Mannheim GmbH, WO 98/14590.

Otra posibilidad de realizar una PCR en presencia de función de corrección de prueba es la utilización de una mezcla de enzimas polimerasa, con una polimerasa que muestre tal actividad de corrección de prueba (por ejemplo, Polimerasa de DNA termoestable con termoestabilidad mejorada y longitud y eficiencia de la extensión de cebadores mejoradas, Barnes W.M., US 5.436.149, PE 0 693 078; Nuevas composiciones de polimerasa y utilización de las mismas, Sorge J.A, Stratagene, WO 95/16028, y amplificación de secuencias largas de ácido nucleico mediante PCR, Cheng S., PE 0 669 401). Es común la utilización de una formulación de una polimerasa de DNA termoestable que comprende un componente mayoritario de al menos una polimerasa de DNA termoestable que carece de actividad exonucleasa 3'-5' y un componente minoritario que muestra actividad exonucleasa 3'-5', por ejemplo polimerasa Taq

y polimerasa de DNA *Pfu*. En estas mezclas la procesividad la confiere la enzima tipo pol I como la polimerasa *Taq* y la función de corrección de pruebas por la polimerasa termoestable tipo B como la *Pfu*. La síntesis de DNA de elevada fidelidad es un parámetro deseable en la amplificación de ácidos nucleicos y otra característica importante es la posibilidad de eliminar la contaminación.

La reacción en cadena de la polimerasa puede amplificar una única molécula alrededor de un billón de veces. Por lo tanto, incluso cantidades minúsculas de un contaminante pueden amplificarse y dar lugar a un resultado de falso positivo. Tales contaminantes son a menudo productos de amplificaciones por PCR previas (contaminación cruzada). Así pues, los investigadores han desarrollado métodos para evitar tal contaminación.

El procedimiento se basa en la sustitución del TTP por dUTP durante la amplificación por PCR para generar DNA que contiene uracilo (U-DNA). El tratamiento de las subsiguientes mezclas de reacción de PCR con glicosilasa de uracil-DNA (UNG), previamente a la amplificación por PCR, degrada el ácido nucleico contaminante y ya no es apropiado para una amplificación. El dUTP puede incorporarse con las polimerasas termoestables tipo pol I pero no por las polimerasas de tipo B (G. Slupphaug, *et al.* (1993) *Anal. Biochem.* **211**:164-169). La baja incorporación de dUTP por las polimerasas de tipo B limita su uso en los laboratorios en los que se analiza el mismo tipo de molde repetidamente mediante la amplificación por PCR.

Las polimerasas de DNA termoestables que muestran actividad exonucleasa 3'-5' también se han aislado a partir de cepas de eubacterias como *Thermotoga* (Polimerasas de DNA termófilas a partir de *Thermotoga neapolitana*, Slater M.R. *et al.*, Promega Corporation, WO 96/41014; Polimerasas de DNA clonadas a partir de *Thermotoga neapolitana* y los mutantes de la misma, Hughes A.J. *et al.*, Life Technologies, Inc. WO 96/10640; Enzima polimerasa de ácido nucleico termoestable purificada a partir de *Thermotoga marítima*, Gelfand D.H. *et al.*, CETUS Corporation, WO 92/03556). Estas enzimas tienen una fuerte actividad exonucleasa 3'-5' que es capaz de eliminar las bases mal incorporadas o mal emparejadas. Una versión modificada por ingeniería genética de esta enzima está disponible comercialmente como ULTma, una polimerasa de DNA que puede utilizarse sin polipéptidos adicionales en el proceso de PCR. Esta enzima es capaz de eliminar las bases mal incorporadas e incorporar dUTP, pero por razones desconocidas la fidelidad no es mayor que la de la polimerasa *Taq* (Exactitud de la replicación de la reacción en cadena de la polimerasa. Diaz R.S. *et al.* *Braz. J. Med. Biol. Res.* (1998) **31**:1239-1242; Fidelidad en la PCR de la polimerasa de DNA *Pfu* y otras polimerasas de DNA termoestables, Cline J. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (1996) **24**:3546-3551).

Para la síntesis de DNA de elevada fidelidad puede utilizarse otra alternativa al uso de las polimerasas de tipo B o mezclas que las contengan, que es la utilización de holoenzima polimerasa de DNA III termófila, un complejo de 18 cadenas polipeptídicas. Estos complejos son idénticos a las replicasas cromosómicas bacterianas, comprenden todos los factores necesarios para sintetizar una cadena de DNA de varios cientos de kilobases o cromosomas completos. Las 10 subunidades diferentes de esta enzima, algunas de las cuales están presentes en múltiples copias, pueden generarse mediante técnicas recombinantes, reconstituidas y utilizadas para la síntesis de DNA *in vitro*. Se propone como un posible uso de estos complejos la amplificación por PCR de ácidos nucleicos de varios cientos a ciento de miles pares de bases. (Enzima derivada de organismos termófilos que funciona como una replicasa cromosómica, y la preparación y usos de la misma, Yurieva O. *et al.*, Universidad Rockefeller, WO 98/45452; Nueva holoenzima polimerasa III termófila, McHenry C., ENZYCO Inc., WO 99/13060)

De acuerdo con esta invención, se ha pretendido desarrollar y proporcionar un sistema de PCR de elevada fidelidad mejorado en el que preferiblemente se pueda incorporar de forma concomitante dUTP. De acuerdo con la presente invención, se proporciona una enzima termoestable que muestra actividad exonucleasa 3', pero no actividad polimerasa de DNA, lo que aumenta la fidelidad de un proceso de amplificación si esta enzima se añade a una segunda enzima termoestable que muestra actividad polimerasa. La primera enzima que se proporciona puede escindir los extremos de cebadores mal emparejados para permitir a la segunda enzima con actividad polimerasa, como por ejemplo la polimerasa *Taq*, que se reasocie y finalice la elongación durante un proceso de síntesis de DNA. La primera enzima es capaz de cooperar como enzima correctora de pruebas con la segunda enzima con actividad polimerasa. La enzima que se encontró era adecuada para esta tarea es, por ejemplo, una *exonucleasa III* termoestable. Es preferible una *exonucleasa III* que funcione en dirección de 3' a 5', cortando en 5' los grupos hidroxilo salientes en 3' del fosfato, y idealmente que funcione solo en DNA de doble cadena. Las funciones exonucleasa 3'-5' de las polimerasas de DNA son activas sobre DNA de cadena doble y sencilla. Esta última actividad puede resultar en la degradación de cebadores, lo que no se desea en los ensayos de PCR. Es preferible que la enzima sea activa a entre 70°C y 80°C, lo suficientemente estable para sobrevivir a los ciclos de desnaturalización e inactiva a temperaturas menores para no degradar los productos de PCR tras la finalización del proceso de PCR. Pueden obtenerse enzimas que muestran estas características de eubacterias termófilas o enzimas relacionadas a partir de arqueobacterias termófilas. Los genomas de tres arqueobacterias termoestables se han secuenciado, *Methanococcus jannaschii* (Secuencia del Genoma Completo de la arqueobacteria metanogénica, *Methanococcus jannaschii*, Bult C.J. *et al.*, (1996) *Science* **273**:1058-1072), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Secuencia Genómica Completa de *Methanobacterium thermoautotrophicum*ΔH: Análisis Funcional y Genómica Comparativa, Smith D.R. *et al.*, *J. of Bacteriology* (1997) **179**:7135-7155) y *Archaeoglobus fulgidus* (La secuencia del Genoma Completo de la arqueobacteria hipertermófila, reductora de azufre *Archaeoglobus fulgidus*, Klenk H.-P. *et al.* (1997) *Nature* **390**:364-370).

## ES 2 269 189 T3

En particular, se proporciona una enzima termoestable que se puede obtener de *Archaeoglobus fulgidus*, que cataliza la degradación de extremos mal emparejados de los cebadores o polinucleótidos en dirección de 3' a 5' en DNA de doble cadena. El gen que codifica la termoestable exonucleasa III que se puede obtener de *Archaeoglobus fulgidus* (Afu) se ha clonado, expresado en *E. coli* y aislado. La enzima es activa en las condiciones de incubación y temperatura que se utilizan en las reacciones de PCR. La enzima apoya a las polimerasas de DNA como las *Taq* en la realización de la síntesis de DNA a tasas de error bajas y la síntesis de productos de más de 3 kb en DNA genómico -el rango superior de los productos sintetizados por la polimerasa *Taq*- con un buen rendimiento con o sin dUTP presente en la mezcla de reacción. Preferiblemente, se utilizaron 50-500 ng de la exonucleasa III que se puede obtener de Afu por cada 2,5 U de polimerasa *Taq* para conseguir un funcionamiento óptimo de la PCR. Más preferiblemente se utilizan entre 67 ng y 380 ng de la exonucleasa III que se puede obtener de Afu por cada 2,5 U de la polimerasa *Taq* en la reacción de PCR.

La ventaja del uso de la primera enzima comparado con otras enzimas es que la primera enzima es preferiblemente activa sobre DNA de doble cadena. La enzima termoestable de esta invención puede utilizarse para cualquier propósito en el que tal actividad enzimática sea necesaria o deseada. En particular, la enzima se utiliza en combinación con una polimerasa de DNA termoestable en la reacción de amplificación de ácido nucleico conocida como PCR para eliminar los extremos de cebadores mal emparejados que dan lugar a una parada prematura, para proporcionar extremos de cebadores se son elongados de forma más efectiva por la polimerasa, para corregir errores de la incorporación de bases y para permitir que la polimerasa genere productos de PCR largos.

Así, el contenido de la presente invención es una composición que comprende una primera enzima termoestable que muestra actividad exonucleasa 3' pero no actividad polimerasa de DNA, y una segunda enzima que muestra actividad polimerasa, en la que la fidelidad de un proceso de amplificación se mejora mediante la utilización de esta composición comparado con la utilización de la segunda enzima únicamente. La primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA incluye también las enzimas apropiadas con actividad polimerasa de DNA reducida o sin nada de actividad. La actividad polimerasa de DNA reducida de acuerdo con la invención significa menos del 50% de dicha actividad de una enzima con actividad polimerasa de DNA. En una realización preferida, la segunda enzima de la composición de la invención carece de actividad de corrección de pruebas. Es particularmente preferible que la segunda enzima sea la polimerasa *Taq*.

Es también un contenido de la presente invención un método de síntesis de DNA utilizando una mezcla que comprende una primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA y una segunda enzima termoestable que muestra actividad polimerasa. De acuerdo con este método, las cadenas terminadas prematuramente se cortan por la degradación de 3' a 5'. De acuerdo con este método, los extremos mal emparejados de un cebador o una cadena en formación se eliminan.

La invención también comprende un método de acuerdo con la descripción anterior en el que el dUTP está presente en la mezcla de reacción, reemplazando en parte o completamente al TTP. Es preferible que de acuerdo con este método se utilice la glicosilasa de uracil-DNA (UDG o UNG) para la degradación de los ácidos nucleicos contaminantes.

Preferiblemente, de acuerdo con este método la mezcla de una primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA y una segunda enzima termoestable que muestra actividad polimerasa genera productos de PCR con tasas de error menores comparado con los productos de PCR producidos por la segunda enzima con actividad polimerasa en ausencia de la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA. El método en el que la mezcla de la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA y una segunda enzima termoestable que muestra actividad polimerasa genera productos de PCR de mayor longitud comparado con los productos de PCR producidos por la segunda enzima con actividad polimerasa en ausencia de la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA. Además, la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA está relacionada con la exonucleasa III de *E. coli*, pero es termoestable de acuerdo con este método. Una realización diferente del método anteriormente descrito es el método en el que se obtienen productos de PCR con extremos romos.

Son también contenido de la presente invención los métodos para la obtención de la enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA de la invención, y los medios y materiales para la producción de esta enzima, como por ejemplo vectores y células huésped (por ejemplo DSM N° 13021).

Los siguientes ejemplos se ofrecen con el propósito de ilustrar, sin limitar, el contenido de la invención.

65

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

**Breve descripción de las figuras**

5 Figura 1

Secuencia de DNA y la secuencia de aminoácidos deducida del gen que codifica la polimerasa de DNA de la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus*.

10

Figura 2

Resistencia a la desnaturalización por calor de la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* recombinante expresada en *E. coli* como se describe en el Ejemplo V.

15

Carril 1: Incubación a 50°C

Carril 2: Incubación a 60°C

20

Carril 3: Incubación a 70°C

Carril 4: Incubación a 80°C

25

Carril 5: Incubación a 90°C

Carril 6: Extracto de las células huésped *E. coli* no transformadas con el gen que codifica la exonucleasa III *Afu*

30

Carril 7: Exonucleasa III de *E. coli*

Carril 8: Marcador de peso molecular

Figura 3

35

Actividad exonucleasa de la exonucleasa III *Afu* en fragmentos de DNA como se describe en el Ejemplo VI.

Carril 1: 10 unidades de exonucleasa III de *E. coli*, incubación a 37°C

40

Carril 2: 50 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 3: 100 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

45

Carril 4: 150 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 5: 100 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 6: 200 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

50

Carril 7: 300 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 8: 250 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

55

Carril 9: 750 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 10: 1  $\mu$ g de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 11: 500 ng de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

60

Carril 12: 1  $\mu$ g de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 13: 1,5  $\mu$ g de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

65

Carril 14: 1,5  $\mu$ g de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

Carril 15: 3  $\mu$ g de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C

## ES 2 269 189 T3

- Carril 16: 4,5  $\mu\text{g}$  de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C  
Carril 17: 7,6  $\mu\text{g}$  de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C  
5 Carril 18: 15,2  $\mu\text{g}$  de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C  
Carril 19: 22,8  $\mu\text{g}$  de exonucleasa III *Afu*, incubación a 72°C  
10 Carril 20: no se añade exonucleasa

### Figura 4

Principio del ensayo de corrección de emparejamientos erróneos.

### Figura 5

Corrección de emparejamientos erróneos de los cebadores en la PCR como se describe en el Ejemplo VII.

- 20 Carril 1: Marcador de peso molecular de DNA V (ROCHE Molecular Biochemicals N° 821705)  
Carril 2: Cebador con mal emparejamiento G:A, amplificación con la polimerasa de DNA *Taq*  
25 Carril 3: Lo mismo que en el carril 2, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
Carril 4: Cebador con mal emparejamiento G:A, amplificación con el sistema de PCR Expand HiFi  
Carril 5: Lo mismo que en el carril 4, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
30 Carril 6: Cebador con mal emparejamiento G:A, amplificación con polimerasa *Taq*/exonucleasa III *Afu*  
Carril 7: Lo mismo que en el carril 6, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
35 Carril 8: Cebador con mal emparejamiento G:A, amplificación con la polimerasa de DNA *Tgo*  
Carril 9: Lo mismo que en el carril 8, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
40 Carril 10: Cebador con mal emparejamiento G:T, amplificación con la polimerasa de DNA *Taq*  
Carril 11: Lo mismo que en el carril 10, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
Carril 12: Cebador con mal emparejamiento G:T, amplificación con el sistema de PCR Expand HiFi  
45 Carril 13: Lo mismo que en el carril 12, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
Carril 14: Cebador con mal emparejamiento G:T, amplificación con polimerasa *Taq*/exonucleasa III *Afu*  
Carril 15: Lo mismo que en el carril 14, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
50 Carril 16: Cebador con mal emparejamiento G:T, amplificación con la polimerasa de DNA *Tgo*  
Carril 17: Lo mismo que en el carril 16, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
55 Carril 18: Marcador de peso molecular de DNA V  
Carril 19: Marcador de peso molecular de DNA V  
60 Carril 20: Cebador con mal emparejamiento G:C, amplificación con la polimerasa de DNA *Taq*  
Carril 21: Lo mismo que en el carril 20, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
Carril 22: Cebador con mal emparejamiento G:C, amplificación con el sistema de PCR Expand HiFi  
65 Carril 23: Lo mismo que en el carril 22, pero subsiguientemente cortado con BsiEI  
Carril 24: Cebador con mal emparejamiento G:C, amplificación con polimerasa *Taq*/exonucleasa III *Afu*

## ES 2 269 189 T3

- Carril 25: Lo mismo que en el carril 24, pero subsiguientemente cortado con BsiEI
- Carril 26: Cebador con mal emparejamiento G:C, amplificación con la polimerasa de DNA *Tgo*
- 5 Carril 27: Lo mismo que en el carril 26, pero subsiguientemente cortado con BsiEI
- Carril 28: Cebador con mal emparejamiento CG:AT, polimerasa de DNA *Taq*
- Carril 29: Lo mismo que en el carril 28, pero subsiguientemente cortado con BsiEI
- 10 Carril 30: Cebador con mal emparejamiento CG:AT, sistema de PCR Expand HiFi
- Carril 31: Lo mismo que en el carril 2, pero subsiguientemente cortado con BsiEI
- 15 Carril 32: Cebador con mal emparejamiento CG:AT, polimerasa *Taq*/exonucleasa III *Afu*
- Carril 33: Lo mismo que en el carril 2, pero subsiguientemente cortado con BsiEI
- Carril 34: Cebador con mal emparejamiento CG:AT, amplificación con la polimerasa de DNA *Tgo*
- 20 Carril 35: Lo mismo que en el carril 2, pero subsiguientemente cortado con BsiEI
- Carril 36: Marcador de peso molecular de DNA V.

### Figura 6A

Tasas de error de las diferentes polimerasas en la PCR

### Figura 6B

Mejora de la fidelidad por la exonucleasa III *Afu* presente en la mezcla de PCR como se describe en el Ejemplo VIII.

Se observó la proporción de colonias azules: blancas y se probaron varias mezclas de polimerasa de DNA *Taq* y exonucleasa III *Afu* (*Taq*/Exo 1:30, *Taq*/Exo 1:20, *Taq*/Exo 1:15, *Taq*/Exo 1:12,5, *Taq*/Exo 1:10, que corresponden a 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq* mezclada con 125 ng, 175 ng, 250 ng, 375 ng y 500 ng de exonucleasa III *Afu*, respectivamente) comparando con la polimerasa de DNA *Taq* (*Taq*), el sistema de PCR Expand HiFi (HiFi) y la polimerasa de DNA *Pwo* (*Pwo*).

### Figura 7

Incorporación de dUTP por la mezcla de polimerasa de DNA *Taq*/exonucleasa III *Afu* como se describe en el Ejemplo IX.

- Carril 1: Marcador de peso molecular de DNA XIV (Roche Molecular Biochemicals N° 1721933)
- 50 Carril 2: Amplificación con 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq*
- Carril 3: Amplificación con 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*
- Carril 4: Amplificación con 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq* y 250 ng de exonucleasa III *Afu*
- 55 Carril 5: Amplificación con 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq* y 375 ng de exonucleasa III *Afu*
- Carril 6: Amplificación con 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq* y 500 ng de exonucleasa III *Afu*

### Figura 8

Degradación de los productos de PCR que contienen dUTP mediante la glicosilasa de uracil-DNA como se describe en el Ejemplo IX.

- 65 Carril 1: Marcador de peso molecular de DNA XIV (Roche Molecular Biochemicals N° 1721933)

## ES 2 269 189 T3

- Carril 2: 1  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, y el subsiguiente tratamiento con la UNG y calor.
- 5 Carril 3: 2  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, y el subsiguiente tratamiento con la UNG y calor.
- Carril 4: 3  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, y el subsiguiente tratamiento con la UNG y calor.
- 10 Carril 5: 4  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, y el subsiguiente tratamiento con la UNG y calor.
- Carril 6: 5  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, y el subsiguiente tratamiento con la UNG y calor.
- 15 Carril 7: 5  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, sin el subsiguiente tratamiento con la UNG y calor.
- Carril 8: 5  $\mu$ l del producto de amplificación obtenido con la polimerasa de DNA *Taq* y 125 ng de exonucleasa III *Afu*, sin el subsiguiente tratamiento con la UNG, pero sí con calor.
- 20 Carril 9: Marcador de peso molecular de DNA XIV (Roche Molecular Biochemicals N° 1721933)

### 25 Figura 9

Efecto de la exonucleasa III *Afu* en la longitud de los productos de PCR. La mezcla de polimerasa de DNA *Taq*/exonucleasa III *Afu* se analizó en DNA genómico humano como se describe en el Ejemplo X.

- 30 Carril 1: fragmento tPA de 9,3 kb con la mezcla *Taq*/Exo III
- Carril 2: "con pol-*Taq*.
- Carril 3: fragmento tPA de 12 kb con la mezcla *Taq*/Exo III
- 35 Carril 4: "con pol-*Taq*
- Carril 5: fragmento tPA de 15 kb con la mezcla *Taq*/Exo III
- 40 Carril 6: "con pol-*Taq*

### Figura 10

45 La exonucleasa III termoestable puede reemplazarse con una polimerasa mutante con actividad polimerasa reducida pero con actividad exonucleasa 3' aumentada, como se describe en el Ejemplo XI.

- Carril 1: Marcador de peso molecular
- 50 Carril 2: Reacción 1, polimerasa *Taq*, fragmento de 4,8 kb
- Carril 3: Reacción 2, polimerasa *Taq* más polimerasa mutante *Tag*, fragmento de 4,8 kb
- Carril 4: Reacción 3, sin polimerasa *Taq*, polimerasa mutante *Tag*, fragmento de 4,8 kb
- 55 Carril 5: Reacción 4, polimerasa *Taq* más Exo III *Afu*, fragmento de 4,8 kb
- Carril 6: Reacción 5, polimerasa *Taq*, fragmento de 9,3 kb
- 60 Carril 7: Reacción 6, *Taq* polimerasa más polimerasa mutante *Tag*, fragmento de 9,3 kb
- Carril 8: Reacción 7, sin polimerasa *Taq*, polimerasa mutante *Tag*, fragmento de 9,3 kb
- Carril 9: Reacción 8, polimerasa *Taq* más Exo III *Afu*, fragmento de 9,3 kb
- 65 Carril 10: Marcador de peso molecular de DNA

## ES 2 269 189 T3

Figura 11

La exonucleasa III Afu no es activa sobre DNA lineal de cadena sencilla, como se describe en el Ejemplo XII

5	Carril 1:	Exo III Afu, sin incubación
	Carril 2:	Exo III Afu, 1 h a 65°C
	Carril 3:	Exo III Afu, 2 h a 65°C
10	Carril 4:	Exo III Afu, 3 h a 65°C
	Carril 5:	Exo III Afu, 4 h a 65°C
15	Carril 6:	Exo III Afu, 5 h a 65°C
	Carril 7:	Tampón de reacción sin enzima, sin incubación
	Carril 8:	Tampón de reacción sin enzima, 5 h a 65°C
20	Carril 9:	Marcador de peso molecular

Figura 12

Comparación de la exonucleasa III Afu con una polimerasa termoestable tipo B en la actividad de degradación de cebadores, como se describe en el Ejemplo XIII.

	Carril 1:	Marcador de peso molecular
30	Carril 2:	1 u de Tgo, preincubada (reacción 1)
	Carril 3:	1,5 u de Tgo, preincubada (reacción 2)
35	Carril 4:	1 u de Tgo, no preincubada (reacción 3)
	Carril 5:	1,5 u de Tgo, no preincubada (reacción 4)
40	Carril 6:	1 u de Tgo, preincubada en ausencia de dNTP (reacción 5)
	Carril 7:	1,5 u de Tgo, preincubada en ausencia de dNTP (reacción 6)
	Carril 8:	1 u de Tgo, no preincubada en ausencia de dNTP (reacción 7)
45	Carril 9:	1,5 u de Tgo, no preincubada en ausencia de dNTP (reacción 8)
	Carril 10:	1 u de Tgo, preincubada en ausencia de dNTP, suplementada con cebador adicional (reacción 9)
50	Carril 11:	1,5 u de Tgo, preincubada en ausencia de dNTP, suplementada con cebador adicional (reacción 10)
	Carril 12:	polimerasa Taq, preincubada (reacción 11)
55	Carril 13:	Taq más 37,5 ng de Exo III Afu, preincubada (reacción 12)
	Carril 14:	Taq más 75 ng de Exo III Afu, preincubada (reacción 13)
	Carril 15:	polimerasa Taq, no preincubada (reacción 14)
60	Carril 16:	Taq más 37,5 ng de Exo III Afu, no preincubada (reacción 15)
	Carril 17:	Taq más 75 ng de Exo III Afu, no preincubada (reacción 16)
65	Carril 18:	Marcador de peso molecular

## ES 2 269 189 T3

### Ejemplo I

#### *Aislamiento de secuencias codificantes*

5 La enzima termoestable preferida aquí es una exodesoxiribonucleasa extremadamente termoestable que se puede obtener a partir de *Archaeoglobus fulgidus* cepa VC-16 (DSM N° 4304). La cepa se aisló de sistemas hidrotermales marinos en la isla Vulcano y en Stufe di Nerone, Nápoles, Italia (Stetter, K.O. *et al.*, *Science* (1987) **236**:822-824). Este organismo es una arqueobacteria extremadamente termófila, metabolizador de azufre, con un rango de crecimiento de entre 60°C y 95°C, con el óptimo en 83°C (Klenk, H.P. *et al.*, *Nature* (1997) **390**:364-370). La secuencia genómica está depositada en la base de datos TIGR. El gen que presuntamente codifica la exonucleasa III (xthA) tiene el N° de acceso AF0580.

15 El peso molecular aparente de la exodesoxiribonucleasa que se puede obtener de *Archaeoglobus fulgidus* es de alrededor de 32.000 daltons al compararlo con estándares de proteína de peso molecular conocido (SDS-PAGE). El peso molecular exacto de la enzima termoestable de la presente invención puede determinarse a partir de la secuencia codificante del gen de la exodesoxiribonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus*.

### Ejemplo II

#### 20 *Clonaje del gen que codifica la exonucleasa III de Archaeoglobus fulgidus*

Se utilizaron alrededor de 6 ml del cultivo celular de DSM N° 4304 para el aislamiento del DNA cromosómico de *Archaeoglobus fulgidus*.

25 Los siguientes cebadores se diseñaron con dianas de restricción compatibles con el sitio de clonaje múltiple del vector de expresión deseado, y complementarios al extremo N- y C-terminal del gen de la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus*:

30 ID de SEC N°:1

N-terminal (diana BamHI): 5'-GAA ACG AGG ATC CAT GCT CAA AAT CGC CAC C-3'

35 ID de SEC N°:2

C-terminal (diana PstI): 5'-TTG TTC ACT GCA GCT ACA CGT CAA ACA CAG C-3'

40 Inicialmente se recogieron las células mediante centrifugaciones repetidas en un eppendorf con tapa de 2 ml a 5.000 rpm. El aislamiento del DNA puede realizarse con cualquier método descrito para el aislamiento a partir de células bacterianas. En este caso, el DNA genómico de *Archaeoglobus fulgidus* se preparó con el equipo de preparación de moldes de PCR High Pure™ (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1796828). Con este método se obtienen alrededor de 6 mg de DNA cromosómico a una concentración de 72 ng/μl.

45 La PCR se realizó con los cebadores descritos anteriormente, en el sistema de PCR Expand™ High Fidelity (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1732641) y 100 ng de DNA genómico de *Archaeoglobus fulgidus* por tubo en cuatro preparaciones idénticas. La PCR se realizó con las siguientes condiciones:

1x 94°C, 2 min;

50 10x 94°C, 10 s; 54°C, 30 s; 68°C, 3 min;

20x 94°C, 10 s; 54°C, 30 s; 68°C, 3 min con 20 s de elongación del ciclo en cada ciclo;

55 1x 68°C, 7 min;

60 Tras la adición de MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 10 mM, el producto de PCR se cortó con BamHI y PstI, 10 unidades de cada uno, a 37°C durante 2 horas. Los productos de la reacción se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Tras la electroforesis se recortaron las bandas apropiadas, se combinaron los recortes de gel, se fundieron, se aislaron los fragmento de DNA mediante digestión de la agarosa y se precipitaron con EtOH. El botón seco se diluyó en 30 μl de H<sub>2</sub>O.

Se digirió el vector de expresión adecuado, aquí el pDS56\_T, con las mismas enzimas de restricción utilizadas para el inserto y se limpiaron con el mismo método.

65 Tras la ligación del inserto y el vector con el equipo Rapid DNA Ligation (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1635379), se transformó el plásmido en el pUBS520 de expresión huésped de *E. coli* 392 (Brinkmann, U. *et al.* (1989) *Gene* **85**:109-114).

## ES 2 269 189 T3

El DNA plasmídico de los transformantes se aisló utilizando el equipo de aislamiento de plásmidos High Pure™ (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1754777) y se caracterizó mediante digestión por restricción con BamHI y PstI y electroforesis en gel de agarosa.

5 Los transformantes de *E. coli* pUBS520 Exo III positivos se almacenaron en medio de cultivo con glicerol a -70°C. La secuencia del gen que codifica la exonucleasa III se confirmó por secuenciación de DNA. Se muestra en la Figura N° 1.

10 El clonaje y expresión de la exonucleasa III a partir de *Archaeoglobus fulgidus* u otros organismos termófilos también puede realizarse mediante otras técnicas utilizando métodos convencionales en la materia (véase por ejemplo Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Lab., 1989).

### Ejemplo III

15 *Expresión de la exonucleasa III Afu recombinante*

El transformante del Ejemplo 1 se cultivó en un fermentador en un medio rico que contenía el antibiótico apropiado.

20 Las células se recogieron a una densidad óptica a [A<sub>540</sub>] de 5,5 mediante centrifugación y se congelaron hasta ser necesitadas o se lisaron mediante un tratamiento con lisozima para producir un extracto celular crudo que contiene la actividad exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus*.

25 El extracto crudo que contiene la actividad exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* se purificó mediante el método descrito en el Ejemplo IV, o mediante otras técnicas de purificación como la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de interacción hidrofóbica.

### Ejemplo IV

30 *Purificación de la exonucleasa III Afu recombinante*

35 El pUBS520 Exo III de *E. coli* (DSM N° 13021) del Ejemplo I se hizo crecer en un fermentador de 10 l en un medio con triptona (20 g/l), extracto de levadura (10 g/l), NaCl (5 g/l) y ampicilina (100 mg/l) a 37°C, se indujo con IPTG (0,3 mM) en la mitad de la fase exponencial de crecimiento y se incubó 14 horas adicionales. Se recogieron alrededor de 45 g de células mediante centrifugación y se almacenaron a -70°C. Se descongelaron 2 g de células y se resuspendieron en 4 ml de tampón A (Tris/HCl 40 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM; 2-mercaptoetanol 7 mM; Pefabloc SC 1 mM). Las células se lisaron en agitación por la adición de 1,2 mg de lisozima durante 30 minutos a 4°C y la adición de 4,56 mg de deoxicolato sódico durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido de 20 minutos a 0°C. 40 El extracto crudo se ajustó a 750 mM de KCl, se calentó durante 15 minutos a 72°C y se centrifugó para eliminar las proteínas desnaturalizadas.

También puede utilizarse una temperatura de calentamiento de hasta 90°C sin destruir (desnaturalización) la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus*. El sobrenadante se dializó contra tampón B (tampón A que contiene un 10% 45 de glicerol) ajustado a 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y se aplicó en una columna Blue Trisacryl M (SERVA, N° 67031) con las dimensiones 1 x 7 cm y 5,5 ml de volumen de lecho, equilibrada con tampón B. La columna se lavó con 16,5 ml de tampón B y la proteína exonucleasa se eluyó con un gradiente lineal de 82 ml de NaCl de 0 a 3 M en tampón B. En las fracciones de la columna se analizó la presencia de la proteína exodesoxiribonucleasa de *Archaeoglobus fulgidus* mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE 10-15% con gradiente. Las fracciones activas, 16,5 ml, se 50 agruparon, concentraron con Aquacide II (Calbiochem N° 17851) y se dializaron contra el tampón de almacenamiento C (Tris/HCl 10 mM, pH 7,9; 2-mercaptoetanol 10 mM; EDTA 0,1 mM; KCl 50 mM; glicerol al 50%). Tras la diálisis se añadieron Thesit y Nonidet P40 hasta una concentración final de cada uno de 0,5%. Esta preparación se almacenó a -20°C.

55 La exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* obtenida era de una pureza del 95% según se estimó mediante la electroforesis en gel con SDS. El rendimiento fue de 50 mg de proteína por cada 2,3 g de masa celular (peso húmedo).

### Ejemplo V

60 *Termoestabilidad de la exonucleasa III recombinante de Archaeoglobus fulgidus*

La termoestabilidad de la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* clonada tal y como se describe en el Ejemplo II se determinó mediante el análisis de la resistencia a la desnaturalización por calor. Tras una lisis como la descrita en el Ejemplo IV se centrifugaron 100 ml del extracto crudo a 15.000 rpm durante 10 min en una centrífuga de Eppendorf. El sobrenadante se alícuotó en cinco nuevos tubos Eppendorf. Los tubos se incubaron durante 10 minutos a cinco 65 temperaturas diferentes, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C. Tras la centrifugación descrita anteriormente, se analizaron las alícuotas de los sobrenadantes mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10-15% con gradiente. Como se

## ES 2 269 189 T3

muestra en la Figura 2, la cantidad de proteína exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* tras la incubación a 90°C fue la misma que la de las muestras tratadas a temperaturas menores. No hubo una pérdida significativa detectable por desnaturalización por calor. A partir de este resultado puede concluirse que la vida media es mayor a diez minutos a 90°C.

5

### Ejemplo VI

#### *Actividad de la exonucleasa III Afu*

10

La exonucleasa III cataliza la eliminación secuencia de mononucleótidos del extremo hidroxilo 3' del dúplex de DNA (Rogers G.S. y Weiss B. (1980) *Methods Enzymol.* **65**:201-211). Durante cada suceso de unión se eliminan un número limitado de nucleótidos. El sustrato preferido son los extremos 3' romos o planos. La enzima no es activa sobre DNA de cadena sencilla, y los extremos 3' protuberantes son más resistentes al corte. El marcador de peso molecular de DNA VI (ROCHE Molecular Biochemicals, N° 1062590) consiste en pBR328 digerido con BglII mezclado con pBR328 digerido con HinfI. Los productos de la digestión con HinfI tienen extremos 3' romos y se espera que sean sustratos preferidos para la degradación por la exonucleasa III, los productos del corte con BglII tienen extremos 3' protuberantes con 3 bases sobresalientes y debería ser más resistente al corte con la exonucleasa III.

15

20

Diluciones seriadas de la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* del Ejemplo IV se incubaron durante 2 horas a 72°C con 0,5 µg de marcador de peso molecular de DNA VI (ROCHE Molecular Biochemicals, N° 1062590) en 25 µl del siguiente tampón de incubación: Tris/HCl 10 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; 2-mercaptoetanol 1 mM; NaCl 100 mM con una cubierta de parafina. Se incluyeron como control 10 unidades de la exonucleasa III de *E. coli* (ROCHE Molecular Biochemicals, N° 779709). La reacción control se realizó a 37°C. Tras la adición de 5 µl de solución de parada (Agarosa al 0,2%, EDTA 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,01%), las mezclas se separaron en un gel de agarosa al 1%. El resultado se muestra en la Figura 3. La exonucleasa III *Afu* discrimina entre los dos tipos diferentes de sustrato. El sustrato preferido son los fragmentos con extremos 3' romos (por ejemplo el fragmento de 1766 pb) y los extremos 3' protuberantes (por ejemplo los fragmentos de 2176 pb, 1230 pb y 1033 pb) son más resistentes a la degradación. Con cantidades mayores de proteína el sustrato se degrada en una proporción similar a la del carril 1, en el que se analizan los productos de la exonucleasa III de *E. coli*. Con cantidades crecientes de proteína exonucleasa *Afu* solo quedó una pequeña cantidad de DNA sustrato (carriles 15 a 19), el retraso de los fragmentos restantes puede ser debido a proteínas de unión al DNA presentes en la preparación como impurezas.

25

30

35

### Ejemplo VII

#### *Corrección de cebadores mal emparejados en una PCR con la exonucleasa III Afu*

40

La eficiencia reparadora de la mezcla de exonucleasa III *Afu*/polimerasa *Taq* durante la PCR se analizó con cebadores mal emparejados en el extremo 3'. El principio del ensayo se muestra en la Figura 4. Para la amplificación por PCR se utilizan juegos de cebadores en los que el cebador directo tiene uno o dos nucleótidos en el extremo 3' que no se emparejan con las bases del DNA molde. La escisión de los extremos de los cebadores mal emparejados y la amplificación del cebador reparado genera un producto que puede cortarse subsiguientemente con la endonucleasa de restricción BsiEI, mientras que el producto que se genera del cebador mal emparejado es resistente al corte.

45

Las secuencias de los cebadores utilizados:

1. reverso:

50

5'-GGT TAT CGA AAT CAG CCA CAG CG-3' (ID de SEC N°: 3)

2. directo 1 (mal emparejamiento g:a):

55

5'-TGG ATA CGT CTG AAC TGG TCA CGG TCA-3' (ID de SEC N°:4)

3. directo 2 (mal emparejamiento g:t):

60

5'-TGG ATA CGT CTG AAC TGG TCA CGG TCT-3' (ID de SEC N°:5)

4. directo 3 (mal emparejamiento g:c):

5'-TGG ATA CGT CTG AAC TGG TCA CGG TCC-3' (ID de SEC N°:6)

65

5. directo 4 (mal emparejamiento de 2 bases):

5'-TGG ATA CGT CTG AAC TGG TCA CGG TAT-3' (ID de SEC N°:7)

## ES 2 269 189 T3

La PCR se llevó a cabo utilizando 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq* (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1435094), 0,25  $\mu\text{g}$  de la exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* del Ejemplo IV, 10 ng de DNA del bacteriófago  $\lambda$ , cada uno de los cebadores a 0,4  $\mu\text{M}$ , dNTP a 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  a 1,5 mM, Tris-HCl a 50 mM, pH 9,2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 16 mM. La PCR se realizó en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de PCR en las siguientes condiciones:

- 5  
1x 94°C, 2 min;  
40x 94°C, 10 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min;  
10 1x 72°C, 7 min;

La función de la mezcla de exonucleasa/polimerasa *Taq* se comparó con controles como 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq*, 0,3 unidades de polimerasa de DNA *Tgo* (ROCHE Diagnostics GmbH) y 0,75  $\mu\text{l}$  de sistema de PCR Expand™ High Fidelity (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1732641). Como indica la correcta digestión de los productos de PCR con BsiEI, la exonucleasa III de *A. fulgidus* muestra actividad correctora de todos los emparejamientos incorrectos descritos con una efectividad del 90 al 100% (Figura 5). Como se esperaba, la polimerasa de DNA *Taq* no mostró actividad correctora, mientras que la polimerasa de DNA *Tgo* con su actividad exonucleasa 3'-5' también los corrigió completamente. El sistema de PCR Expand™ High Fidelity solo mostró actividad correctora al 100% con los emparejamientos incorrectos de dos bases. El resto de emparejamientos incorrectos se repararon con una efectividad de aproximadamente el 50%.

### Ejemplo VIII

#### 25 *Fidelidad de las mezclas de exonucleasa III Afu/polimerasa de DNA Taq en el proceso de PCR*

La fidelidad de las mezclas de exonucleasa III *Afu*/polimerasa de DNA *Taq* en el proceso de PCR se determinó en un ensayo basado en la amplificación, circularización y transformación del derivado del pUC19, pUCIQ17, que contiene un alelo *lac I*<sup>q</sup> funcional (Frey, B. y Suppmann B. (1995) *Biochemica* 2:34-35). Las mutaciones derivadas de la PCR en *lac I* resultan en una desrepresión de la expresión de *lac Z $\alpha$*  y la subsiguiente formación de una enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional que puede detectarse fácilmente en placas indicadoras con X-Gal. Las tasas de error de las mezclas de polimerasa *Taq*/exonucleasa *Afu* determinadas con este ensayo de fidelidad de la PCR basado en *lac I* se determinaron comparando con las de la polimerasa de DNA *Taq*, el sistema de PCR Expand HiFi (Roche Molecular Biochemicals) y la polimerasa de DNA *Pwo* (Roche Molecular Biochemicals) como controles.

35 El plásmido pUCIQ17 se linearizó mediante la digestión con DraII para poder utilizarse como sustrato para la amplificación por PCR con los enzimas testados.

40 Ambos cebadores utilizados tienen dianas ClaI en sus extremos 5' y 3':

ID de SEC N°:8

Cebador 1: 5'-AGCTTATCGATGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG-3'

45 ID de SEC N°:9

Cebador 2: 5'-AGCTTATCGATAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGC-3'

50 La longitud del producto de PCR resultante es de 3493 pb.

La PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  en presencia de  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (25°C),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  12,5 mM, KCl 35 mM, dNTP 200  $\mu\text{M}$  y 2,5 unidades de polimerasa *Taq* y 125 ng, 175 ng, 250 ng, 375 ng y 500 ng, respectivamente de exonucleasa III *Afu*.

55 Las condiciones de ciclado fueron como sigue:

- 60 1x desnaturalización del molde durante 2 min a 95°C  
8x desnaturalización a 95°C durante 10 s.  
hibridación a 57°C durante 30 s.  
65 elongación a 72°C durante 4 min.

## ES 2 269 189 T3

- 16x desnaturalización a 95°C durante 10 s.  
hibridación a 57°C durante 30 s.  
5 elongación a 72°C durante 4 min  
+ elongación del ciclo de 20 s. en cada ciclo

Tras la PCR, los productos de PCR se precipitaron con PEG (Barnes, W.M. (1992) *Gene* **112**:229), el DNA se sometió a restricción con ClaI y se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El DNA aislado se ligó utilizando el equipo Rapid DNA Ligation (Roche Molecular Biochemicals) y los productos de ligación se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  y seplaquearon en placas TN Amp X-Gal. La cepa de *E. coli* que complementa en  $\alpha$ , DH5 $\alpha$ , transformada con el plásmido resultante pUCIQ17 (3632 pb), muestra colonias blancas (lac I+) en placas TN (Bactotripton a al 1,5%, NaCl al 1%, Agar al 1,5%) que contienen ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y X-Gal (al 0,004% p/v). Las mutaciones resultan en colonias azules.

Tras la incubación a 37°C durante toda la noche, se contaron las colonias azules y blancas. La tasa de error (f) por pb se calculó con una ecuación transformada como han publicado Keohavong y Thilly (Keohavong, P. y Thilly, W. (1989) *PNAS USA* **86**:9253):

$$f = -\ln F / d \times b \text{ pb}$$

en la que F es la fracción de colonias blancas:

25 F = colonias blancas (lac I+)/número total de colonias;

d es el número de duplicaciones del DNA:

30  $2^d$  = DNA obtenido/DNA de partida;

y b es el tamaño de diana efectivo del gen *lac I* (1080 pb), que es de 349 pb de acuerdo con Provost *et al.* (Provost *et al.* (1993) *Mut. Res.* **288**:133).

35 Los resultados que se muestran en la Figura 6A y Figura 6B demuestran que la presencia de exonucleasa III termoestable en la mezcla de reacción resulta en tasas de error menores. En función de la proporción entre polimerasa y exonucleasa la tasa de error disminuye. La fidelidad que se alcanza con la mezcla de polimerasa *Taq*/exonucleasa III *Afu* más óptima ( $4,44 \times 10^{-6}$ ) está en un rango similar al de la mezcla *Taq/Pwo* (Expand HiFi;  $2,06 \times 10^{-6}$ ). La evaluación de las condiciones óptimas de tampón proporcionarán una mejora de la fidelidad. La proporción entre la polimerasa y la exonucleasa debe optimizarse. Las cantidades elevadas de exonucleasa reducen el rendimiento de producto, aparentemente al reducir la eficiencia de la amplificación (*Taq/Exo* 1:10 que corresponden a 2,5 unidades de polimerasa *Taq* y 500 ng de exonucleasa III *Afu*).

45 La fidelidad de este sistema puede además optimizarse utilizando técnicas convencionales en la materia, por ejemplo alterando los componentes del tampón, optimizando la concentración de los componentes individuales o cambiando las condiciones de ciclado.

Ejemplo IX

50 *Incorporación de dUTP en presencia de la exonucleasa III Afu durante la PCR*

Se analizó la síntesis de DNA de la mezcla de exonucleasa *Afu*/polimerasa *Taq* con el TTP completamente reemplazado por dUTP. La comparación de la incorporación de TTP o dUTP se determinó en una PCR utilizando 2,5 unidades de polimerasa de DNA *Taq*, en presencia de 0,125  $\mu$ g, 0,25  $\mu$ g, 0,375  $\mu$ g y 0,5  $\mu$ g de exonucleasa III de *Archaeoglobus fulgidus* del Ejemplo IV en DNA genómico humano nativo como molde utilizando el gen de la  $\beta$ -globina como diana. Se utilizaron los siguientes cebadores:

directo: 5'-TGGTTGAATTCATATATCTTAGAGGGAGGGC-3' (ID de SEC N°:10)

60 reverso: 5'-TGTGTCTGCAGAAAACATCAAGGGTCCCATA-3' (ID de SEC N°: 11)

La PCR se realizó en 50  $\mu$ l de volumen con las siguientes condiciones de ciclado:

- 65 1x 94°C, 2 min;  
40x 94°C, 10 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min;  
1x 72°C, 7 min;

## ES 2 269 189 T3

Alícuotas de la reacción de PCR se separaron en geles de agarosa. Como se muestra en la Figura 7, la síntesis de DNA con este sistema de molde/cebador en presencia de dUTP es posible con hasta 375 ng de exonucleasa III *Afu*. La incorporación de dUTP puede demostrarse mediante el tratamiento con la glicosilasa de uracil-DNA (ROCHE Diagnostics GmbH, N° 1775367) de alícuotas de los productos de reacción de PCR durante 30 min a temperatura ambiente y la subsiguiente incubación durante 5 min a 95°C para cortar los polinucleótidos en los lugares apurínicos, lo que da lugar a la completa degradación de los fragmentos. El análisis de los productos de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa se muestra en la Figura 8.

### 10 Ejemplo X

#### *Efecto de la exonucleasa III Afu sobre la longitud del producto de PCR*

La polimerasa *Taq* es capaz de sintetizar productos de PCR de hasta 3 kb de longitud en moldes genómicos. Para estimar la capacidad de la mezcla de polimerasa *Taq*/exonucleasa *Afu* de sintetizar productos de mayor longitud, se analizó la mezcla de enzimas con DNA genómico humano como molde con tres parejas de cebadores diseñados para amplificar productos de 9,3 kb, 12 kb y 15 kb de longitud. Los sistemas de tampón utilizados son del sistema de PCR Expand Long Template (Roche Molecular Biochemicals N° Cat. 1 681 834). Las reacciones se realizaron en 50 µl de volumen con 250 ng de DNA genómico humano, 220 ng de cada cebador, 350 µM de dNTP y 2,5 unidades de polimerasa *Taq* y 62,5 ng de exonucleasa *Afu* con las condiciones que se indican en la Tabla 1:

TABLA 1

Longitud del producto	Cebadores	N° tampón Expand Long Template	Programa de PCR
9,3 kb	directo 7	1	1x desnat. a 94°C durante 2 min
	reverso 14		10x desnat. a 94°C durante 10 s hibridación a 65°C durante 30 s elongación a 68°C durante 8 min
			20x desnat. a 94°C durante 10 s hibridación a 65°C

ES 2 269 189 T3

5			durante 30 s
10			elongación a 68°C
15			durante 8 min más
			elongación de ciclo
			de 20 s por ciclo
20	12 kb	2	1x elongación a 68°C
25	directo 1		durante 7 min
30	reverso 3		1x desnat. a 94°C
35			durante 2 min
40			10x desnat. a 94°C
45			durante 10 s
50			hibridación a 62°C
55			durante 30 s
60			elongación a 68°C
65			durante 12 min
			20x desnat. a 94°C
			durante 10 s
			hibridación a 62°C
			durante 30 s
			elongación a 68°C
			durante 12 min más
			elongación de ciclo
			de 20 s por ciclo
			1x elongación a 68°C
			durante 7 min
	15 kb	3	el mismo que para 12 kb
	directo 1		
	reverso 2		

## ES 2 269 189 T3

Los cebadores específicos para la amplificación de los genes tPA utilizados:

Cebador 7a directo:

5 5'-GGAAGTACAGCTCAGAGTTCTGCAGCACCCCTGC-3' (ID de SEC N°:12)

Cebador 14a reverso:

10 5'-CAAAGTCATGCGGCCATCGTTCAGACACACC-3' (ID de SEC N°:13)

Cebador 1 directo:

5'-CCTTCACTGTCTGCCTAACTCCTTCGTGTGTCCC-3' (ID de SEC N°:14)

15 Cebador 2 reverso:

5'-ACTGTGCTTCTGACCCATGGCAGAAGCGCCTTC-3' (ID de SEC N°:15)

Cebador 3 reverso

20 5'-CCTTCTAGAGTCAACTCTAGATGTGGACTTAGAG-3' (ID de SEC N°:16)

25 Como se muestra en la Figura 9 es posible sintetizar productos de al menos 15 kb de longitud con la mezcla de polimerasa *Taq*/exonucleasa *Afu*.

### Ejemplo XI

30 La exonucleasa III termoestable puede reemplazarse por una polimerasa mutante con actividad polimerasa reducida pero con mayor actividad exonucleasa en 3'.

35 La polimerasa de DNA de *Thermococcus aggregans* (Tag) descrita por Niehaus F., Frey B. y Antranikian G. en la WO 97/35988 o en *Gene* (1997) **204**(1-2), 153-8, con un cambio de aminoácido en la posición 385 en la que la tirosina está reemplazada por asparagina (Boehlke *et al.* pendiente de publicación y solicitud de patente europea 00105 155.6), muestra solo un 6,4% de la actividad polimerasa pero un 205% de la actividad exonucleasa de la polimerasa de DNA salvaje. Esta enzima se utilizó para demostrar que la invención no está restringida a las enzimas de tipo exonucleasa III sino que también incluye otros tipos de enzimas que aportan una actividad exonucleasa 3'.

40 Las reacciones se realizaron en 50  $\mu$ l de volumen con 200 ng de DNA genómico humano, dNTP 200  $\mu$ M, 220 ng de cada cebador y tampón Expand HiFi con Mg<sup>++</sup> en las reacciones 1-4 o tampón Expand Long Template 1 en las reacciones 5-8 (Figura 10). Para amplificar un fragmento de 4,8 kb del gen tPA, se utilizaron los cebadores tPA 7a directo (5'-GGA AGT ACA GCT CAG AGT TCT GCA GCA CCC CTG C-3', ID de SEC N°:12) y tPA 10a reverso (5'-GAT GCG AAA CTG AGG CTG GCT GTA CTG TCT C-3', ID de SEC N°:17) en las reacciones 1-4.  
45 Para amplificar un fragmento de 9,3 kb del gen tPA, se utilizaron los cebadores tPA 7a directo y tPA 14a reverso (5'-CAA AGT CAT GCG GCC ATC GTT CAG ACA CAC C-3', ID de SEC N°:13) en las reacciones 5-8. Se añadieron 2,5 unidades de polimerasa *Taq* a las reacciones 1, 2, 4, 5, 6 y 8, no a las reacciones 3 y 7, que se utilizaron como controles negativos. Se añadieron 11 ng de polimerasa mutante *Tag* a las reacciones 2, 3, 6 y 7, y se añadieron 150 ng de Exonucleasa III *Afu* a las reacciones 4 y 8.

50 Programas de ciclado utilizados en las reacciones 1-4:

1x 94°C, 2 min,  
55 10x 94°C, 10 s  
62°C, 30 s  
68°C, 4 min  
60 20x 94°C, 10 s  
62°C, 30 s  
68°C, 4 min, más elongación de ciclo de 20 s por ciclo  
65 1x 68°C durante 7 min

## ES 2 269 189 T3

Para las reacciones 5-8:

- 1x 94°C, 2 min,  
5 10x 94°C, 10 s  
65°C, 30 s  
68°C, 8 min  
10 20x 94°C, 10 s  
65°C, 30 s  
15 68°C, 8 min, más elongación de ciclo de 20 s por ciclo  
1x 68°C durante 7 min

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio (Figura 10). Los datos muestran que la polimerasa Taq es capaz de amplificar el fragmento de 4,8 kb pero con bajo rendimiento. La combinación de polimerasa Taq con polimerasa mutante Tag o Exo III Afu resulta en un fuerte aumento del rendimiento del producto. La enzima polimerasa mutante Tag por sí misma no es capaz de sintetizar este producto.

Se obtienen resultados similares con el sistema de 9,3 kb. Utilizando la polimerasa Taq sola no se detecta producto. En combinación con la polimerasa mutante Tag o Exo III Afu, el producto de PCR esperado se obtiene con un alto rendimiento.

Estos resultados demuestran que la polimerasa Taq no es capaz de amplificar fragmentos de DNA de varias kb a partir de DNA genómico y apoya la hipótesis de Barnes (Barnes W.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:2216-2220) de que la limitación en longitud de la amplificación por PCR es causada por la baja eficiencia de extensión en los lugares de incorporación de pares de bases mal emparejados. Tras la eliminación de los nucleótidos mal emparejados en el extremo del cebador, la polimerasa Taq es capaz de continuar la síntesis de DNA. La cadena de ácido nucleico finalizada como un producto completo puede servir entonces como molde para la unión de cebadores en los subsiguientes ciclos.

Ejemplo XII

*La exo III Afu no es activa sobre DNA lineal de cadena sencilla*

Las reacciones se realizaron en 50  $\mu$ l de volumen con 270 ng de exo III Afu, 5 mg de un oligonucleótido de 49 pb en tampón de PCR Expand HiFi con MgCl<sub>2</sub> y se incubaron durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas a 65°C. Tras la adición de 10  $\mu$ l de solución de proteinasa K (20 mg/ml), las muestras se incubaron durante 20 min a 37°C. Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa al 3,5% que contenían bromuro de etidio.

El resultado se expone en la Figura 11. Ésta muestra que el ácido nucleico tiene el mismo tamaño en todos los carriles. El producto obtenido tras la incubación de hasta 5 horas (carril 6) con Exo III Afu tiene el mismo tamaño que los controles (carriles 1, 7 y 8). No se pudo observar una reducción significativa en la intensidad del oligonucleótido de tamaño completo ni una pincelada derivada de los productos degradados.

Ejemplo XIII

*Comparación de la actividad de degradación de cebadores entre la Exonucleasa III Afu y una polimerasa termoestable tipo B*

Las polimerasas termoestable de tipo B se ha descrito que tienen actividad nucleasa en cadena sencilla y doble (Kong H. *et al.* (1993) *Journal Biol. Chem.* **268**:1965-1975). Esta actividad es capaz de degradar moléculas de cebador sin tener en cuenta si están hibridados con el molde o en cadena sencilla. El reemplazo de una polimerasa termoestable de tipo B por una exonucleasa termoestable en la mezcla de reacción podría ser ventajoso respecto a la estabilidad de los cebadores de cadena sencilla u otros ácidos nucleicos presentes en la mezcla de reacción.

Para analizar la actividad de degradación de cebadores, las mezclas de reacción sin DNA molde se incubaron durante 1 hora a 72°C, luego se añadió DNA y se realizó la PCR. Los resultados se compararon con las reacciones que contenían polimerasa Tgo como ejemplo de polimerasa termoestable tipo B (Angerer B. *et al.* WO 98/14590). Como control, se utilizaron las mismas mezclas sin incubación previa. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

## ES 2 269 189 T3

TABLA 2

N° de reacción	enzima(s)	preincuba- ción en au- sencia de DNA molde	preinc. en presencia de nucleó- tidos	segunda adi- ción de ceba- dor tras la preincubación
1	Tgo	si	si	
2	Tgo	si	si	
3	Tgo	no		
4	Tgo	no		
5	Tgo	si	no	
6	Tgo	si	no	
7	Tgo	no		
8	Tgo	no		
9	Tgo	si	no	si
10	Tgo	si	no	si
11	Taq	si	si	
12	Taq más Exo III Afu	si	si	
13	Taq más Exo III Afu	si	si	
14	Taq	no		
15	Taq más Exo III Afu	no		
16	Taq más Exo III Afu	no		

Como diana de la amplificación se escogió un fragmento del gen p53, los cebadores utilizados fueron: p53I 5'-GTC CCA AGC AAT GGA TGA T-3' (ID de SEC N°:18) y p53II 5'-TGG AAA CTT TCC ACT TGA T-3' (ID de SEC N°:19). Las reacciones de PCR se realizaron en 50 µl de volumen.

## ES 2 269 189 T3

Las reacciones N° 1-10 contenían 200 ng de DNA genómico humano, 40 pmol de cada cebador, Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 17,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, Tween al 0,5%, DMSO al 2,5%, BSA 250 µg/ml y 1 unidad (reacciones número 1, 3, 5, 7 y 9) o 1,5 unidades (reacciones número 2, 4, 6, 8 y 10) de polimerasa Tgo y dNTP 200 µM.

5 Las reacciones número 11 a 16 contenían 2,5 unidades de polimerasa Taq, tampón con Mg<sup>++</sup> Expand HiFi, 40 pmol de cebadores, dNTP 200 µM y 100 ng de DNA genómico humano. Las reacciones número 12 y 15 contenían 37,5 ng de exo III Afu, y las reacciones número 13 y 16 contenían 75 ng de Exo III Afu.

10 Como se describe en la tabla 2, las reacciones 1, 2, 5, 6 y de 11 a 13 se incubaron durante 1 hora a 72°C en ausencia de DNA molde. El DNA molde se añadió antes de que se iniciara la PCR. Las reacciones 5, 6, 9 y 10 se preincubaron en ausencia de nucleótidos, las reacciones 9 y 10 se suplementaron con 40 pmol adicionales de cebador tras el paso de preincubación. A causa de la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa Taq, a las reacciones de 11 a 13 se les añadió la enzima tras la preincubación.

15 Condiciones de la PCR:

1x 94°C, 2 min

35x 94°C, 10 s

55°C, 30 s

72°C, 4 min

25 1x 72°C durante 10 min

Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio (Figura 12).

30 Cuando la polimerasa Tgo se incubó con el cebador en ausencia de DNA molde (reacciones 1, 2, 5 y 6) y se comparó con las correspondientes reacciones sin preincubación (3, 4, 7 y 8) se observó una clara diferencia. La preincubación resulta en una marcada reducción del producto PCR, obviamente afecta al menos a uno de los componentes esenciales, más probablemente el cebador de la PCR. La adición de 40 pmol más de cebador de PCR (reacciones 9 y 10) tras el paso de preincubación resulta en señales fuertes con una intensidad comparable a la de la reacción control que no se preincubó. Esto indica que la polimerasa Tgo, una polimerasa termoestable de tipo B, degrada los cebadores de la PCR en ausencia de molde, independientemente de si los dNTP están o no presentes.

35 Los productos de PCR obtenidos de las reacciones 12 y 13, en las que los cebadores se preincubaron con Exonucleasa III Afu antes de la adición de DNA molde y polimerasa Taq dieron lugar a bandas similares a las obtenidas en las reacciones 15 y 16, en las que no se introdujo el paso de preincubación. De estas bandas de fuerte intensidad similares puede concluirse que no ha ocurrido o ha ocurrido poca degradación de los cebadores y que los oligonucleótidos de cadena sencilla son sustratos pobres para la Exonucleasa III Afu. De las bandas de fuerte intensidad o de la potenciación del rendimiento de productos de PCR puede concluirse que la enzima potencia la fidelidad de un proceso de amplificación.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una primera enzima termoestable que muestra actividad exonucleasa 3' pero no actividad polimerasa de DNA y una segunda enzima termoestable que muestra actividad polimerasa de DNA, en la que la fidelidad de un proceso de amplificación está potenciada por la utilización de la composición comparado con el uso de la segunda enzima únicamente.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la primera enzima se puede obtener de *Archeoglobus fulgidus*.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la segunda enzima carece de actividad de corrección de pruebas.
- 15 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 en la que la segunda enzima es la polimerasa Taq.
5. Un método para preparar o amplificar DNA utilizando una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. El método de la reivindicación 5 en el que las cadenas terminadas prematuramente se recortan por degradación de 3' a 5'.
7. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 o 6 en el que se eliminan los extremos mal emparejados de un cebador o de la cadena en formación.
- 25 8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7 en el que en la mezcla de reacción está presente dUTP en lugar de TTP.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que se utiliza una glicosilasa de uracil-DNA (UNG) para la degradación de ácidos nucleicos contaminantes.
- 30 10. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 9 en el que la mezcla de
- 35 - una primera enzima termoestable que muestra actividad exonucleasa 3' pero no actividad polimerasa de DNA y
  - una segunda enzima termoestable que muestra actividad polimerasa de DNA
- 40 produce productos de PCR con tasas de error menores comparado con los productos de PCR generados por la segunda enzima con actividad polimerasa de DNA en ausencia de la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA.
- 45 11. El método de la reivindicación 10 en el que la mezcla de la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA y la segunda enzima termoestable con actividad polimerasa de DNA produce productos de PCR de mayor longitud comparado con los productos de PCR generados por la segunda enzima con actividad polimerasa de DNA en ausencia de la primera enzima termoestable con actividad exonucleasa 3' pero sin actividad polimerasa de DNA.
- 50 12. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 11 en el que la primera enzima termoestable que muestra actividad exonucleasa 3' pero no actividad polimerasa de DNA está relacionada con la exonucleasa III derivada de *E. coli*, pero es termoestable.
- 55 13. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 12 en el que se obtienen productos de PCR con extremos romos.

55

60

65

ES 2 269 189 T3

Figura 1: 1/2

Secuencia del gen de la exonucleasa III de *archaeoglobus fulgidus*

ID de SEC N°: 20/21

```

ATGCTCAAAATCGCCACCTTCAACGTAACCTCCATCAGGAGCAGACTGCACATCGTGATT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACGAGTTTTAGCGGTGGAAGTTGCATTTGAGGTAGTCCTCGTCTGACGTGTAGCACTAA

a    M L K I A T F N V N S I R S R L H I V I -

CCGTGGCTGAAGGAGAACAAGCCTGACATTCTATGCATGCAGGAGACGAAGGTTGAGAAC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGCACC GACTTCCTCTTGTTCGGACTGTAAGATACGTACGTCTCTGCTTCCAACCTCTG

a    P W L K E N K P D I L C M Q E T K V E N -

AGGAAGTTTCTTGAGGCCGATTTTCACCGCATCGGCTACCACGTCGTCTTCAGCGGGAGC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TCCTTCAAAGGACTCCGGCTAAAAGTGGCGTAGCCGATGGTGCAGCAGAAGTCGCCCTCG

a    R K F P E A D F H R I G Y H V V F S G S -

AAGGGAAGGAATGGAGTGGCCATAGCTTCCCTCGAAGAGCCTGAGGATGTCAGCTTCGGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTCCCTTCTTACCTCACCGGTATCGAAGGGAGCTTCTCGGACTCCTACAGTCGAAGCCA

a    K G R N G V A I A S L E E P E D V S F G -

CTCGATTGAGAGCCGAAGGACGAGGACAGGCTGATAAGGGCAAAGATAGCTGGCATAGAC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GAGCTAAGTCTCGGCTTCTGCTCCTGTCCGACTATTCCCGTTTCTATCGACCGTATCTG

a    L D S E P K D E D R L I R A K I A G I D -

GTGATTAACACCTACGTTCCCTCAGGGATTCAAAATTGACAGCGAGAAGTACCAGTACAAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CACTAATTGTGGATGCAAGGAGTCCCTAAGTTTTAACTGTCGCTCTTCATGGTCATGTTC

a    V I N T Y V P Q G F K I D S E K Y Q Y K -

CTCCAGTGGCTTGAGAGGCTTTACCATTACCTTCAAAAAACCGTTGACTTCAGAAGCTTT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GAGGTCACCGAACTCTCCGAAATGGTAATGGAAGTTTTTGGCAACTGAAGTCTTCGAAA

a    L Q W L E R L Y H Y L Q K T V D F R S F -

GCTGTTTGGTGTGGAGACATGAACGTTGCTCCTGAGCCAATCGACGTTCACTCCCCAGAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CGACAAACCACACCTCTGTACTTGCAACGAGGACTCGGTTAGCTGCAAGTGAGGGGTCTG

a    A V W C G D M N V A P E P I D V H S P D -

AAGCTGAAGAACCACGTTCTGCTTCCACGAGGATGCGAGAAGGGCATACAAAAAATATCTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TTGACTTCTTGGTGCAGACGAAGGTGCTCCTACGCTCTTCCCGTATGTTTTTTTATGAG

a    K L K N H V C F H E D A R R A Y K K I L -

```

ES 2 269 189 T3

Figura 1: 2/2

```

          GAACTCGGCTTTGTTGACGTGCTGAGAAAAATACATCCCAACGAGAGAATTTACACCTTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
          CTTGAGCCGAAACAACACTGCACGACTCTTTTATGTAGGGTTGCTCTCTTAAATGTGGAAG
a      E L G F V D V L R K I H P N E R I Y T F -

          TACGACTACAGGGTTAAGGGAGCCATTGAGCGGGGGCTGGGATGGAGGGTTGATGCCATC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
          ATGCTGATGTCCCAATTCCTCGGTAACCTCGCCCCGACCCTACCTCCCAACTACGGTAG
a      Y D Y R V K G A I E R G L G W R V D A I -

          CTCGCCACCCACCCCTCGCCGAAAGATGCGTGGACTGCTACGCAGACATCAAACCGAGG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
          GAGCGGTGGGGTGGGGAGCGGCTTTCTACGCACCTGACGATGCGTCTGTAGTTTGGCTCC
a      L A T P P L A E R C V D C Y A D I K P R -

          CTGGCAGAAAAGCCATCCGACCACCTCCCTCTCGTTGCTGTGTTTGACGTGTAG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 774
          GACCGTCTTTTCGGTAGGCTGGTGGAGGGAGAGCAACGACACAAACTGCACATC
a      L A E K P S D H L P L V A V F D V * -
```

Figura 2:

Estabilidad en temperatura de la exonucleasa III Afu

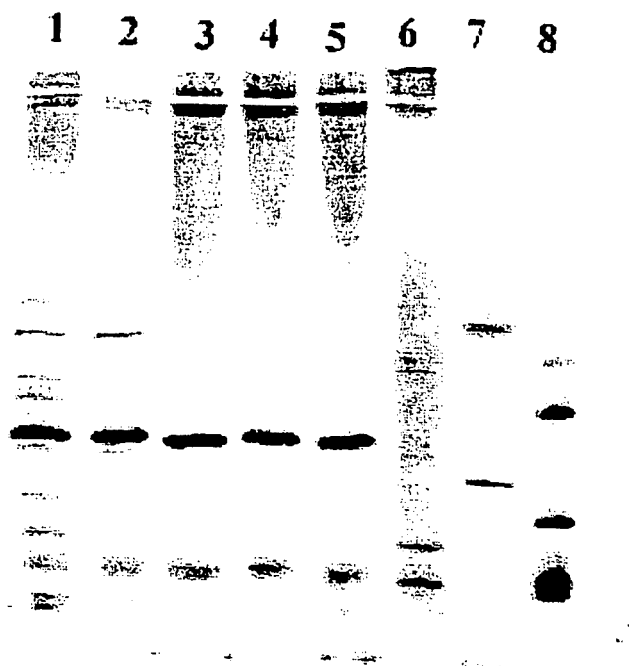


Figura 3:

Análisis de la actividad exonucleasa III

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

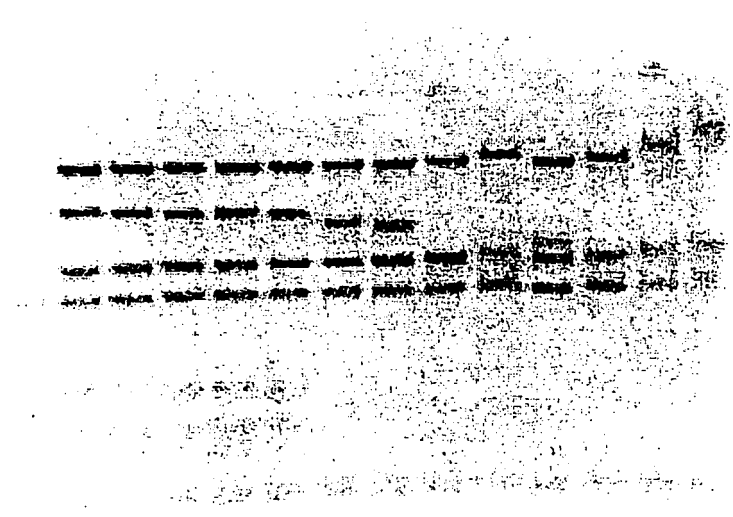


Figura 4:

Principio del ensayo de corrección de cebador en 3'

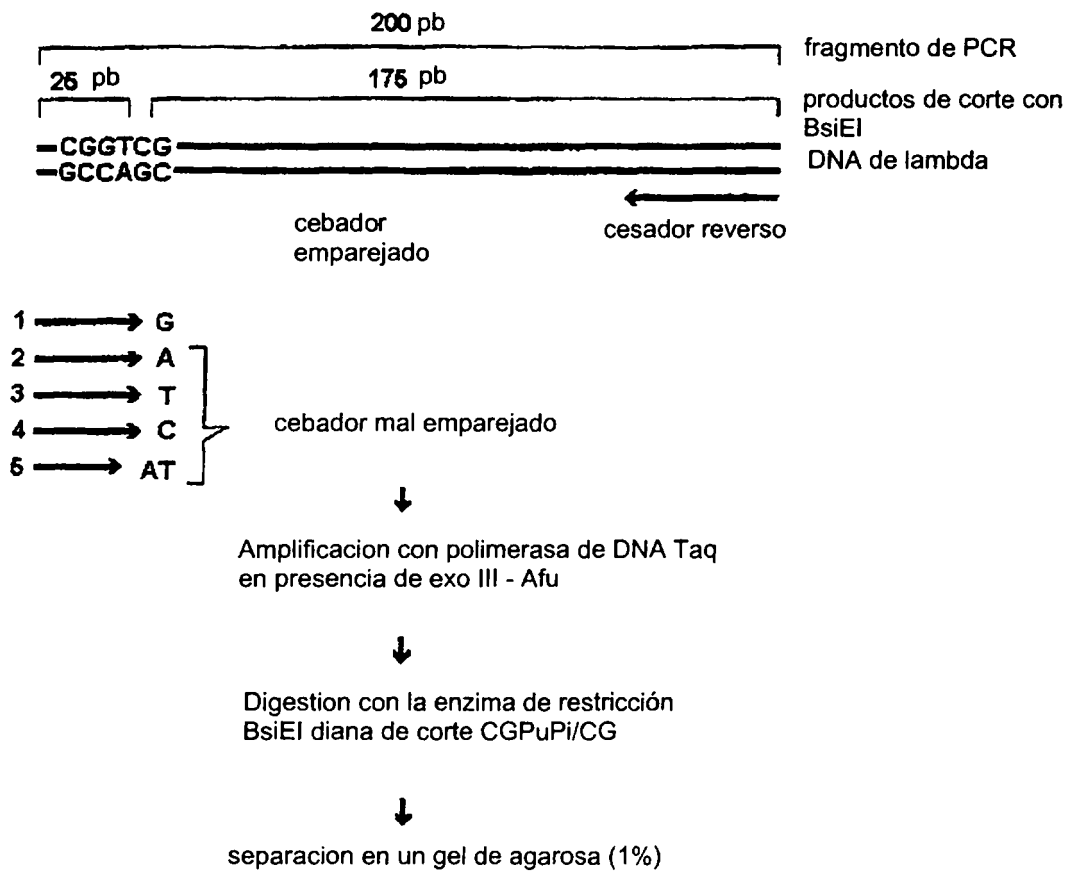


Figura 5:

Corrección de cebadores mal emparejados  
en la PCR

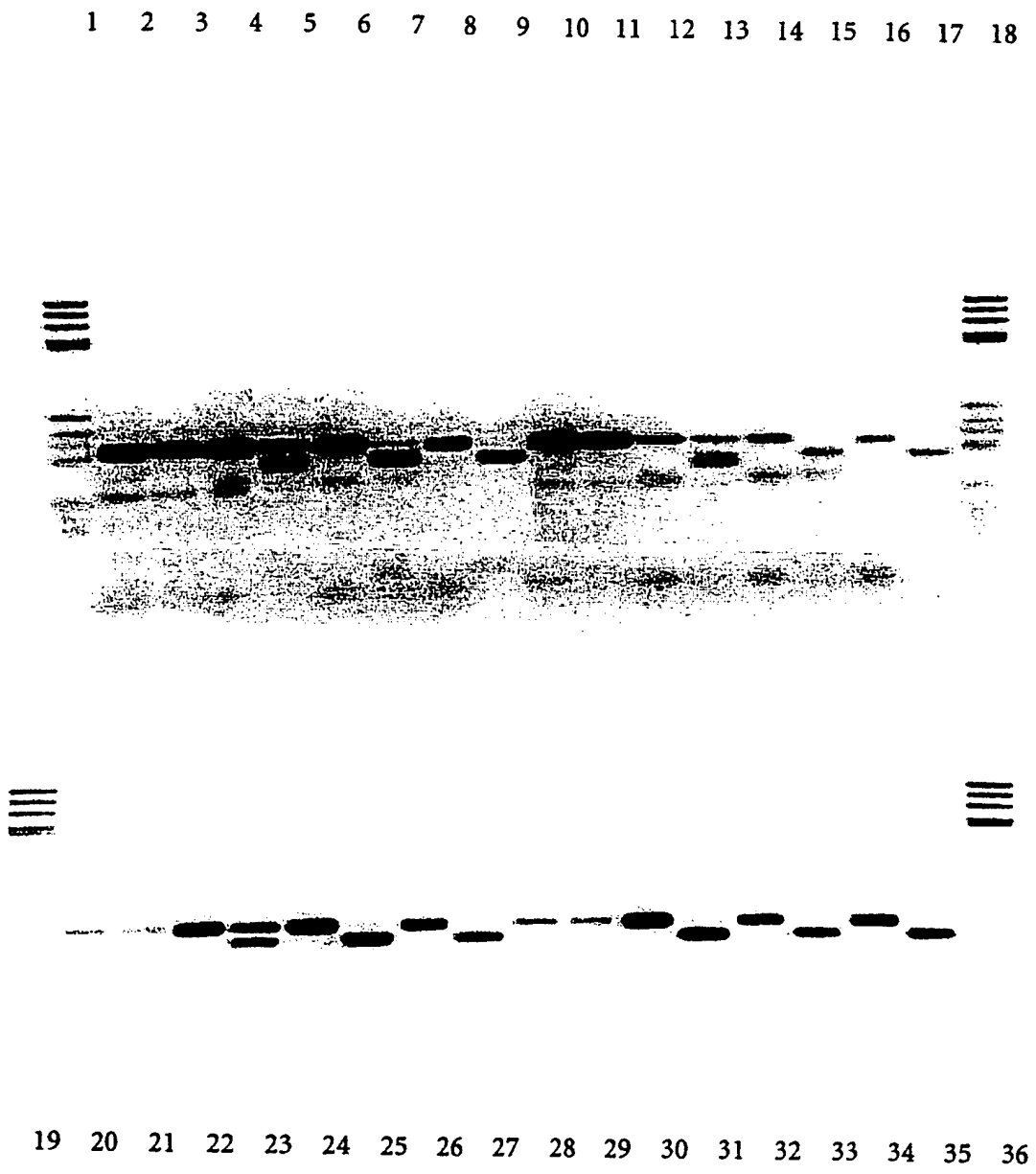


Figura 6A

Tasas de error de diferentes polimerasas de DNA en la PCR

Polimerasa	conc. molde (ng)	rendimiento (ng)	Duplicaciones del DNA d	colonias azules lacI <sup>r</sup>	colonias blancas lac <sup>s</sup> *	numero total de colonias	% lac	tasa de error
Taq Ch.	10	11650	10.2	130	2261	2391	5.4	$1.57 \times 10^{-3}$
HIFI Ch.	10	11650	10.2	40	5458	5498	0.72	$2.06 \times 10^{-3}$
Pwo	10	9675	9.9	17	5891	5908	0.29	$8.32 \times 10^{-7}$
Taq/Exo 1	10	11650	10.2	94	4291	4385	2.14	$6.10 \times 10^{-3}$
Taq/Exo 2	10	11125	10.1	146	7644	7790	1.87	$5.36 \times 10^{-3}$
Taq/Exo 3	10	8500	9.7	133	8188	8321	1.6	$4.74 \times 10^{-3}$
Taq/Exo 4	10	1292	7	79	7236	7315	1.08	$4.44 \times 10^{-3}$
Taq/Exo 5	10	236	4.6	25	2674	2724	0.92	$1.16 \times 10^{-3}$ <sup>17</sup>

\* Debido a la proporción no favorable de Taq: Exo, el rendimiento de producto fue bajo. Esto resulta en una eficiencia de amplificación d aparentemente baja, que es un parámetro importante en la fórmula que se utiliza para el cálculo de la tasa de error.

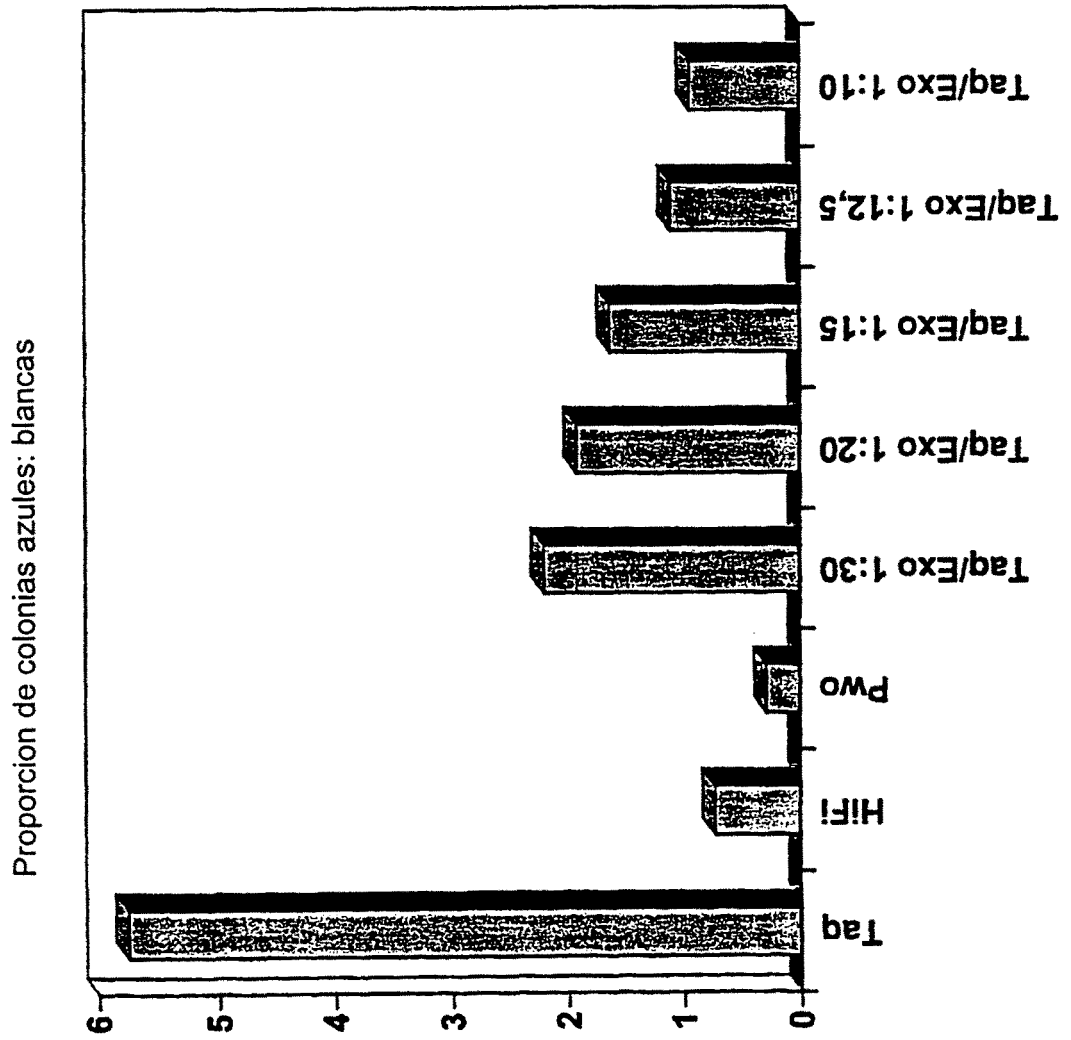


Figura 6B:

Figura 7:

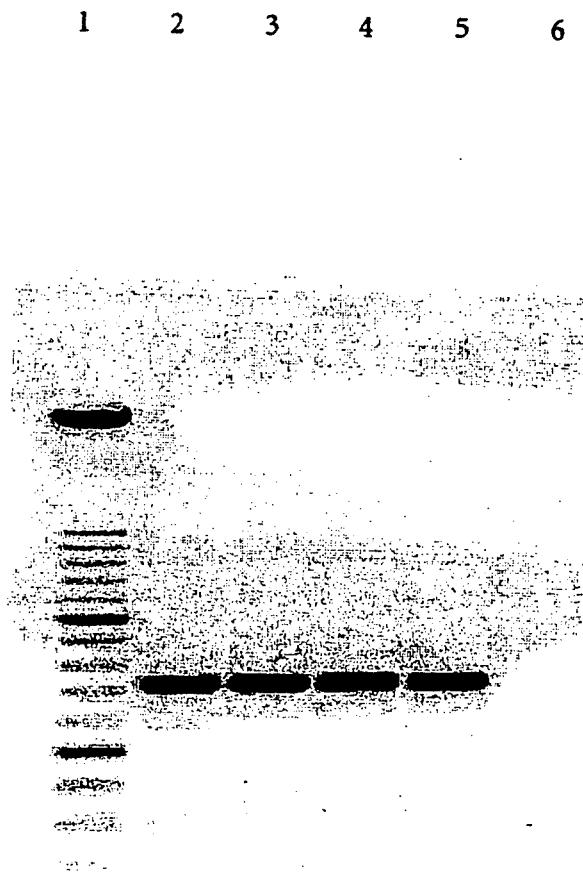


Figura 8:

Tratamiento con UNG de los productos de PCR que contienen dUMP

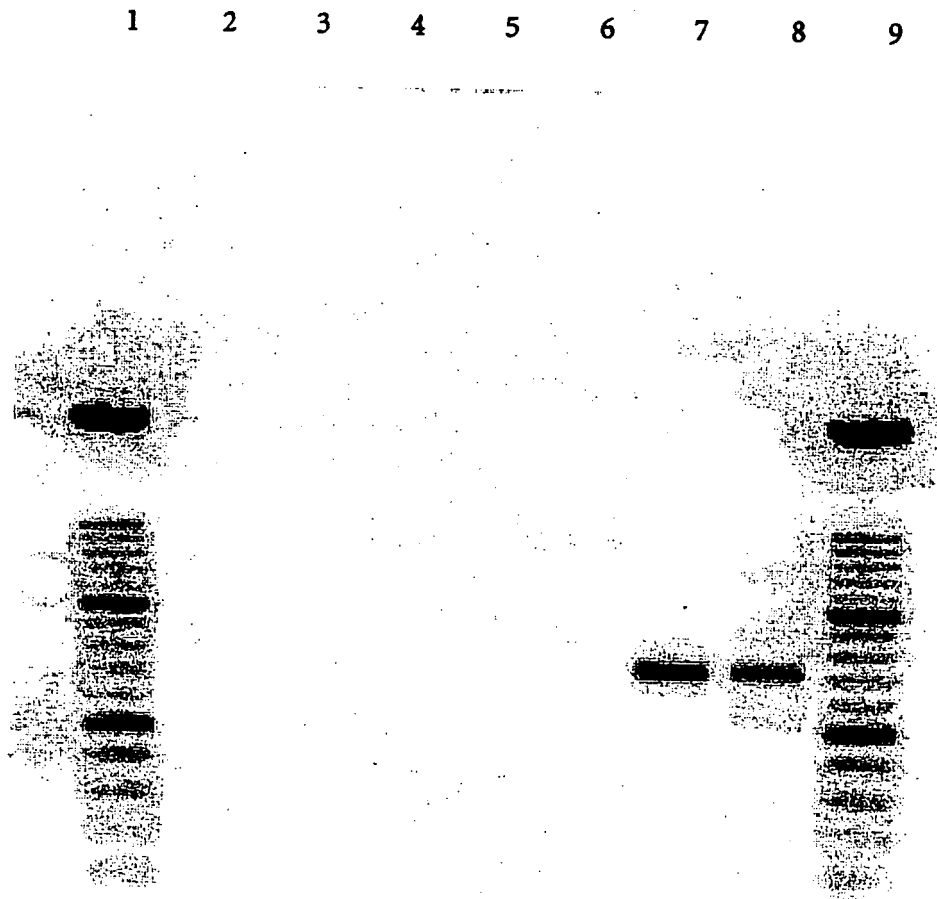


Figura 9:

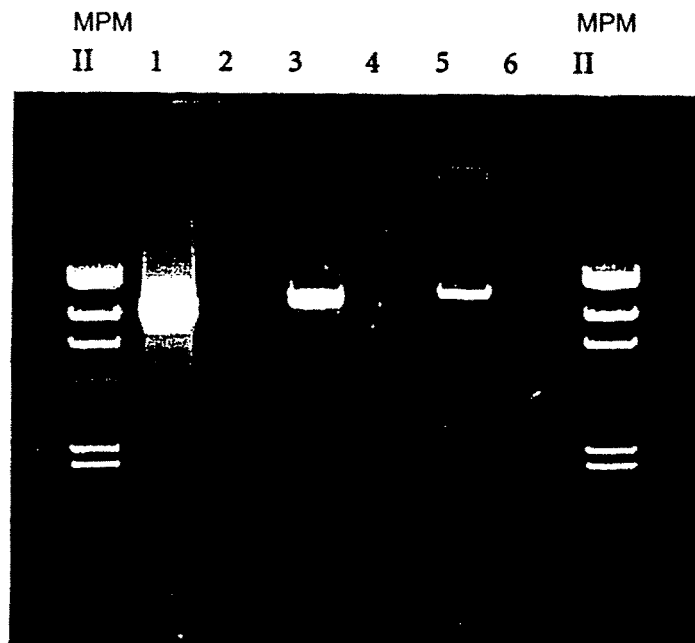


Figura 10:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MPM	1	2	3	4	5	6	7	8	MPM

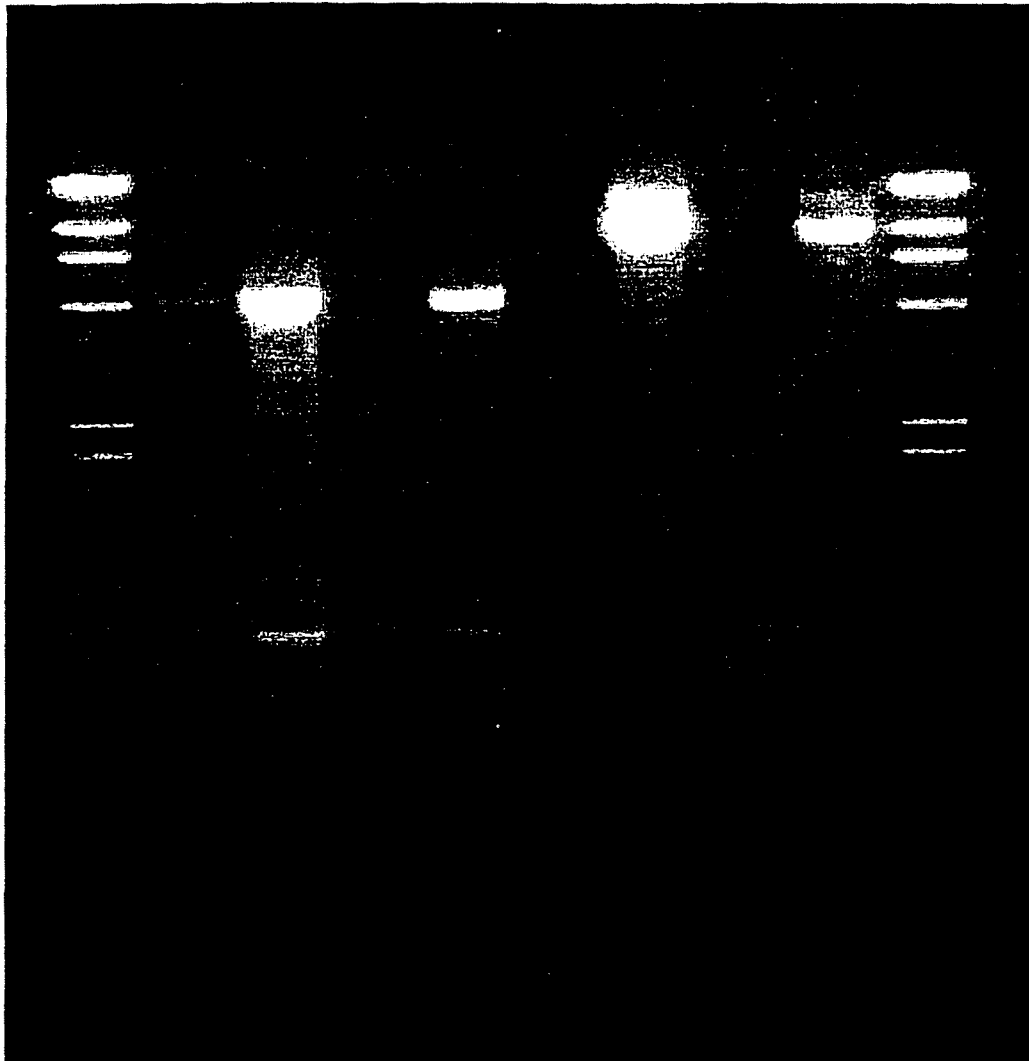


Figura 11

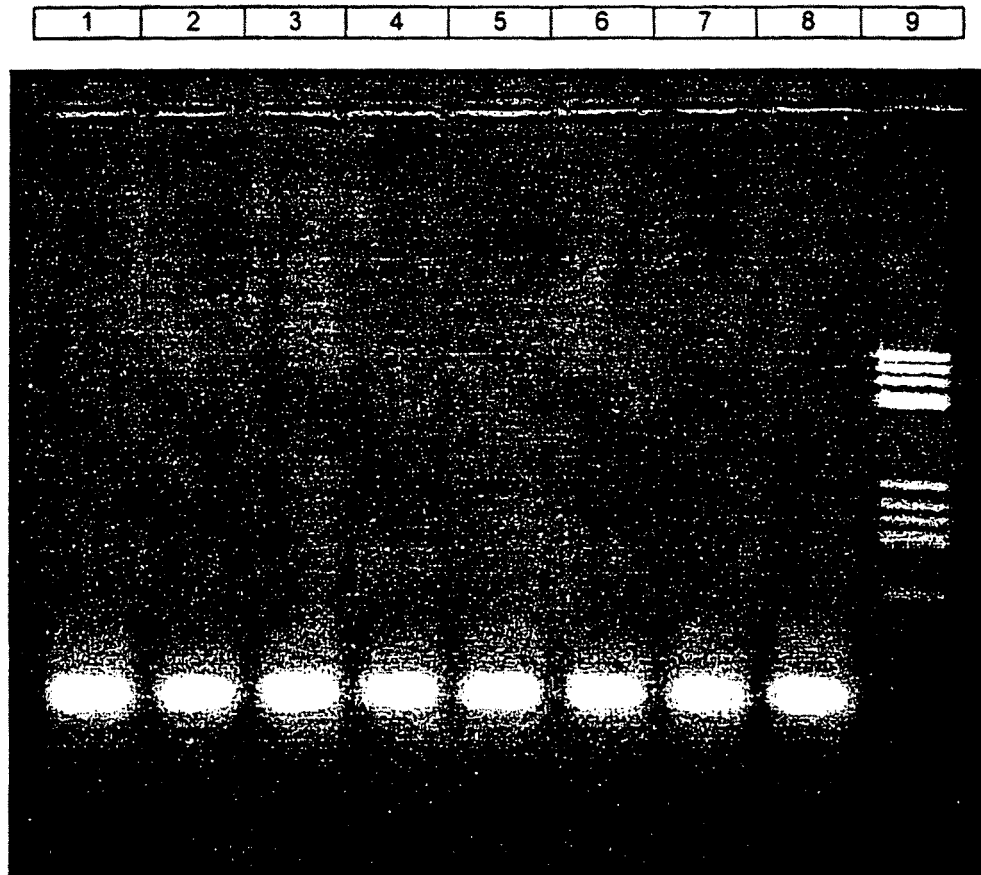
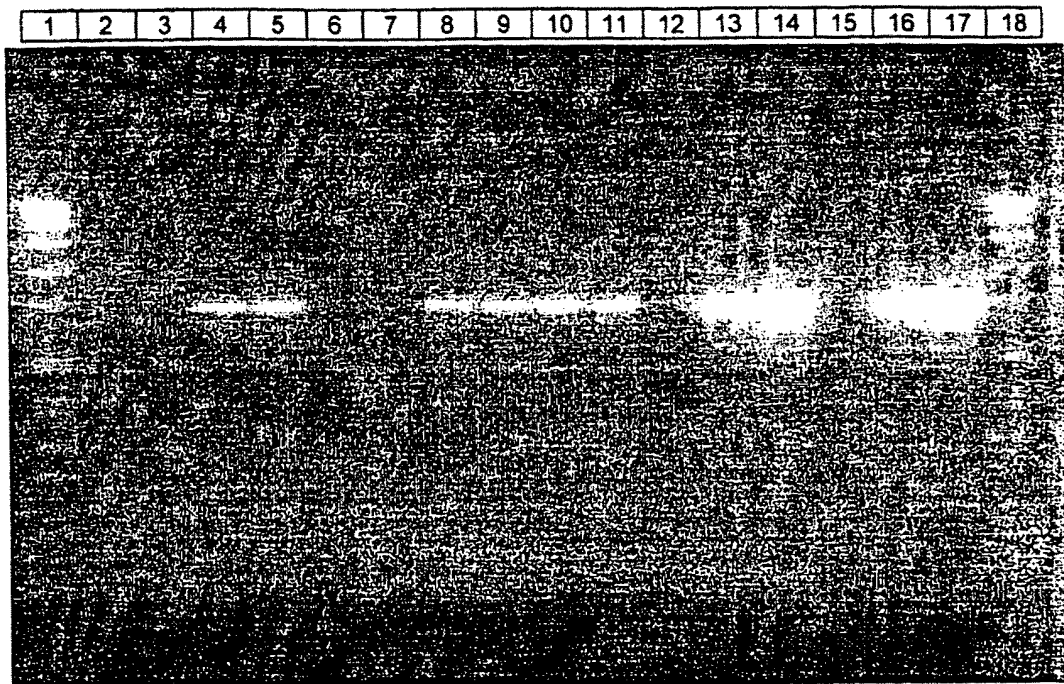


Figura 12



# ES 2 269 189 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Roche Diagnostics GmbH	
5	<120> Enzima termoestable que promueve la fidelidad de las polimerasas de DNA termoestables para la mejora de la síntesis y amplificación de ácidos nucleicos <i>in vitro</i>	
	<130> 5304/OA/	
	<140>	
10	<141>	
	<160> 21	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
15	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 1	
25	gaaacgagga tccatgctca aaatgccac c	31
	<210> 2	
30	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 2	
40	ttgttactg cagctacag tcaaacacag c	31
	<210> 3	
	<211> 23	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 3	
	ggttatcgaa atcagccaca gcg	23
55	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
65		

## ES 2 269 189 T3

	<400> 4	
	tggatacgtc tgaactggtc acggtca	27
5	<210> 5	
	<211> 27	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
15	<400> 5	
	tggatacgtc tgaactggtc acggtct	27
20	<210> 6	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
30	<400> 6	
	tggatacgtc tgaactggtc acggtcc	27
35	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
45	<400> 7	
	tggatacgtc tgaactggtc acggtat	27
50	<210> 8	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
60	<400> 8	
	agcttatcga tggcactttt cggggaaatg tgcg	34
65	<210> 9	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 269 189 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 9	
	agcttatcga taageggatg ccgggagcag acaagc	36
10	<210> 10	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 10	
20	tgggtgaatt catatatctt agagggaggg c	31
	<210> 11	
25	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 11	
35	tgtgtctgca gaaaacatca aggtcccat a	31
	<210> 12	
40	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 12	
50	ggaagtacag ctcagagttc tgcagcaccc ctgc	34
	<210> 13	
	<211> 31	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 13	
65	caaagtcatg cggccatcgt tcagacacac c	31
	<210> 14	
	<211> 34	

## ES 2 269 189 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 14	
10	ccttcactgt ctgcctaact ccttcgtgtg tccc	34
	<210> 15	
	<211> 34	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 15	
25	actgtgcttc ctgacccatg gcagaagcgc cttc	34
	<210> 16	
	<211> 34	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 16	
40	ccttctagag tcaactctag atgtggactt agag	34
	<210> 17	
	<211> 31	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 17	
	gatgcgaaac tgaggctggc tgtactgtct c	31
55	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 18	
	gtccaagca atggatgat	19

ES 2 269 189 T3

<210> 19  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

10 <400> 19

tggaacttt ccacttgat

19

15 <210> 20  
 <211> 774  
 <212> DNA  
 <213> *Archaeoglobus fulgidus*  
 20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(774)

25 <400> 20

	atg ctc aaa atc gcc acc ttc aac gta aac tcc atc agg agc aga ctg	48
	Met Leu Lys Ile Ala Thr Phe Asn Val Asn Ser Ile Arg Ser Arg Leu	
30	1 5 10 15	
	cac atc gtg att ccg tgg ctg aag gag aac aag cct gac att cta tgc	96
	His Ile Val Ile Pro Trp Leu Lys Glu Asn Lys Pro Asp Ile Leu Cys	
	20 25 30	
35	atg cag gag acg aag gtt gag aac agg aag ttt cct gag gcc gat ttt	144
	Met Gln Glu Thr Lys Val Glu Asn Arg Lys Phe Pro Glu Ala Asp Phe	
	35 40 45	
40	cac cgc atc ggc tac cac gtc gtc ttc agc ggg agc aag gga agg aat	192
	His Arg Ile Gly Tyr His Val Val Phe Ser Gly Ser Lys Gly Arg Asn	
	50 55 60	
45	gga gtg gcc ata gct tcc ctc gaa gag cct gag gat gtc agc ttc ggt	240
	Gly Val Ala Ile Ala Ser Leu Glu Glu Pro Glu Asp Val Ser Phe Gly	
	65 70 75 80	
50	ctc gat tca gag ccg aag gac gag gac agg ctg ata agg gca aag ata	288
	Leu Asp Ser Glu Pro Lys Asp Glu Asp Arg Leu Ile Arg Ala Lys Ile	
	85 90 95	
55	gct ggc ata gac gtg att aac acc tac gtt cct cag gga ttc aaa att	336
	Ala Gly Ile Asp Val Ile Asn Thr Tyr Val Pro Gln Gly Phe Lys Ile	
	100 105 110	
60	gac agc gag aag tac cag tac aag ctc cag tgg ctt gag agg ctt tac	384
	Asp Ser Glu Lys Tyr Gln Tyr Lys Leu Gln Trp Leu Glu Arg Leu Tyr	
	115 120 125	
65	cat tac ctt caa aaa acc gtt gac ttc aga agc ttt gct gtt tgg tgt	432
	His Tyr Leu Gln Lys Thr Val Asp Phe Arg Ser Phe Ala Val Trp Cys	
	130 135 140	
65	gga gac atg aac gtt gct cct gag cca atc gac gtt cac tcc cca gac	480
	Gly Asp Met Asn Val Ala Pro Glu Pro Ile Asp Val His Ser Pro Asp	
	145 150 155 160	

ES 2 269 189 T3

```

aag ctg aag aac cac gtc tgc ttc cac gag gat gcg aga agg gca tac 528
Lys Leu Lys Asn His Val Cys Phe His Glu Asp Ala Arg Arg Ala Tyr
165 170 175

5 aaa aaa ata ctc gaa ctc ggc ttt gtt gac gtg ctg aga aaa ata cat 576
Lys Lys Ile Leu Glu Leu Gly Phe Val Asp Val Leu Arg Lys Ile His
180 185 190

10 ccc aac gag aga att tac acc ttc tac gac tac agg gtt aag gga gcc 624
Pro Asn Glu Arg Ile Tyr Thr Phe Tyr Asp Tyr Arg Val Lys Gly Ala
195 200 205

15 att gag cgg ggg ctg gga tgg agg gtt gat gcc atc ctc gcc acc cca 672
Ile Glu Arg Gly Leu Gly Trp Arg Val Asp Ala Ile Leu Ala Thr Pro
210 215 220

20 ccc ctc gcc gaa aga tgc gtg gac tgc tac gca gac atc aaa ccg agg 720
Pro Leu Ala Glu Arg Cys Val Asp Cys Tyr Ala Asp Ile Lys Pro Arg
225 230 235 240

25 ctg gca gaa aag cca tcc gac cac ctc cct ctc gtt gct gtg ttt gac 768
Leu Ala Glu Lys Pro Ser Asp His Leu Pro Leu Val Ala Val Phe Asp
245 250 255

gtg tag 774
Val

30 <210> 21
<211> 258
<212> PRT
35 <213> Archaeoglobus fulgidus
<400> 21

40 Met Leu Lys Ile Ala Thr Phe Asn Val Asn Ser Ile Arg Ser Arg Leu
1 5 10 15

His Ile Val Ile Pro Trp Leu Lys Glu Asn Lys Pro Asp Ile Leu Cys
20 25 30

45 Met Gln Glu Thr Lys Val Glu Asn Arg Lys Phe Pro Glu Ala Asp Phe
35 40 45

50 His Arg Ile Gly Tyr His Val Val Phe Ser Gly Ser Lys Gly Arg Asn
50 55 60

55 Gly Val Ala Ile Ala Ser Leu Glu Glu Pro Glu Asp Val Ser Phe Gly
65 70 75 80

Leu Asp Ser Glu Pro Lys Asp Glu Asp Arg Leu Ile Arg Ala Lys Ile
85 90 95

60 Ala Gly Ile Asp Val Ile Asn Thr Tyr Val Pro Gln Gly Phe Lys Ile
100 105 110

65 Asp Ser Glu Lys Tyr Gln Tyr Lys Leu Gln Trp Leu Glu Arg Leu Tyr
115 120 125

```

ES 2 269 189 T3

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