



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 278 249**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04018913 .6**

⑧6 Fecha de presentación : **10.08.2004**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1507002**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

⑤4 Título: **Fragmento Taq polimerasa termoestable.**

③0 Prioridad: **12.08.2003 EP 03017636**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

⑦3 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

⑦2 Inventor/es: **Ankenbauer, Waltraud;**
Meier, Thomas;
Deufel, Annette;
Heindl, Dieter;
Betzl, Gisela;
Schmuck, Rainer;
Schneidinger, Bernd y
Strey, Jessica

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Fragmento Taq polimerasa termoestable.

5 La presente invención está dirigida al ámbito de la biología molecular. Especialmente, la invención se refiere a un polipéptido con actividad DNA polimerasa. La invención proporciona un polipéptido con actividad DNA polimerasa termoestable, en la que la termoestabilidad está mejorada. La invención también proporciona un método para producir dicho polipéptido.

10 En el ámbito, se conocen muy bien las DNA polimerasas de microorganismos mesófilos como *E. coli*. Véanse, por ejemplo, Bessman *et al.*, J. Biol. Chem. 223 (1957) 171-177; y Buttin, G., y Kornberg, A., J. Biol. Chem. 241 (1966) 5419-5427. También se conocen en el ámbito las DNA polimerasas de microorganismos termófilos como las de *Thermus aquaticus*. La utilización de enzimas termoestables para amplificar secuencias de ácidos nucleicos existentes en cantidades que se consideran grandes en comparación con las cantidades presentes inicialmente se describió en las patentes estadounidenses US 4 683 195, US 4 683 202 y US 4 965 188, que describen el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en sus siglas en inglés). Las casas comerciales, como Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) comercializan reactivos para PCR y publican protocolos para su realización. En el proceso de la PCR se utilizan cebadores, moldes, nucleósidos trifosfato, las condiciones de reacción y un tampón apropiados y polimerasa, e implica la desnaturalización del DNA diana, la hibridación de los cebadores y la síntesis de cadenas complementarias por la polimerasa. El producto resultante de la extensión de cada cebador se convierte en un molde para la producción de la secuencia de ácidos nucleicos deseada. Las patentes describen que si la polimerasa utilizada es una enzima termoestable, entonces no es necesario añadirla después de la fase de desnaturalización, dado que el calor no eliminará la actividad de la polimerasa. No obstante, el calentamiento repetido como en el caso del proceso cíclico de la PCR tendrá un efecto sobre la actividad enzimática de la polimerasa en función de su termoestabilidad. 25 Tras un número determinado de ciclos de PCR, una polimerasa con una termoestabilidad elevada mantendrá una mayor actividad enzimática que otra polimerasa con una termoestabilidad menor. Por tanto, la termoestabilidad es una característica deseable en una polimerasa.

Las patentes estadounidenses US 4 889 818 y US 5 079 352 describen el aislamiento y la expresión en un sistema 30 recombinante de una DNA polimerasa termoestable con un peso molecular de alrededor de 94 kDa procedente de *Thermus aquaticus* (DNA polimerasa Taq, denominada también como TaqWT) y la utilización de esa polimerasa en procesos de PCR.

Se prefiere especialmente la DNA polimerasa de *T. Aquaticus* para su uso en PCR y en otras técnicas de DNA re- 35 combinante, debido a su elevada tasa de síntesis (capaz de polimerizar alrededor de 75 nucleótidos por segundo). Sin embargo, todavía existe la necesidad de disponer de otras polimerasas termoestables alternativas. Sería especialmente ventajoso disponer de una DNA polimerasa con una termoestabilidad mejorada para los casos en los que una incubación inicial en calor prolongada precede a la PCR. Un ejemplo de dichos casos es la activación de la actividad DNA polimerasa de una DNA polimerasa que ha sido modificada químicamente con el objetivo de bloquear su actividad 40 enzimática de forma reversible.

Particularmente, la termoestabilidad de la DNA polimerasa Taq supera la de otras 10 polimerasas. Mientras que la vida media a 95°C de la TaqWT purificada es de alrededor de 40 min en una preparación estabilizada y de alrededor de 20 min en una mezcla de reacción típica utilizada para una PCR mediante LightCycler, en otras DNA polimerasas como la DNA polimerasa Pwo (procedente de *Pyrococcus woesei*; catálogo Roche núm. 1664947) es superior. La 45 DNA polimerasa Pwo muestra una estabilidad térmica superior con una vida media que supera las 2 h a 100°C en comparación con la vida media de la DNA polimerasa Taq, que es inferior a 5 min a esa temperatura.

La patente internacional WO 91/02090 describe una DNA polimerasa termoestable procedente de *Thermus aqua- 50 ticus*. Esta polimerasa es un producto de degradación de 80 u 85 kDa de la polimerasa intacta (peso molecular de 94 kDa) y se dice que fundamentalmente no posee una actividad exonucleasa 5'-3'. No se proporcionan datos de la secuencia de esa polimerasa.

Lawyer, F.C., *et al.* han descrito en J. Biol. Chem. 264 (1989) 6427-6437 el aislamiento, la caracterización y la 55 expresión del gen de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* en *E. coli*. También describen la clonación de vectores de expresión que constan de una secuencia de DNA que codifica un fragmento de la DNA polimerasa Taq al que le falta el extremo N-terminal de la enzima salvaje.

Kaledin *et al.* han descrito en Chemical Abstract 93, núm. 40169p (1989) la purificación de una enzima DNA 60 polimerasa termoestable procedente de *Thermus aquaticus* que presenta un peso molecular aproximado entre 60 y 62 kDa. No se proporcionan datos de la secuencia de esa polimerasa.

Chien *et al.* han descrito en Chemical Abstract 85, núm. 155559t (1976) la purificación de una enzima DNA 65 polimerasa termoestable procedente de *Thermus aquaticus*.

Está descrito que el peso molecular de esta enzima es de 68 kDa determinado por centrifugación en gradiente de sacarosa y de 63 kDa determinado mediante filtración en gel. No se proporcionan datos de la secuencia de esa polimerasa.

La patente estadounidense US 5 616 494 muestra un fragmento truncado enzimáticamente activo de la DNA polimerasa Taq que no posee el fragmento N-terminal de 235 residuos de aminoácidos. Está descrito que la enzima purificada es totalmente activa, no obstante, posee una procesividad disminuida y le falta la actividad 5'-exonucleasa. Cuando se compara con la DNA polimerasa Taq salvaje, son necesarias más unidades de DNA polimerasa del fragmento delecionado para completar la reacción de amplificación por PCR. La forma truncada con una metionina adicional en el extremo N-terminal se expresó en *E. coli*.

La patente estadounidense US 5 885 813 describe dos formas truncadas activas de la DNA polimerasa Taq con una delección en el extremo N-terminal de 271 y 272 aminoácidos, ambas con un residuo de tirosina en la posición correspondiente al residuo 667 de la DNA polimerasa Taq salvaje en su lugar de unión a dNMP. Las dos formas truncadas se expresaron en *E. coli* con un codón de iniciación adicional que codifica metionina fusionado con cada patrón de lectura.

La patente estadounidense US 5 079 352 muestra una forma truncada de DNA polimerasa Taq (Ejemplo IX) con un peso molecular aproximado de 61 kDa. Durante la purificación, esta forma (también conocida como el fragmento Stoffel) se consideró originalmente como un artefacto proteolítico. La secuenciación N-terminal reveló que la forma truncada es el resultado de la escisión proteolítica entre Glu289 y Ser290. La delección de 289 aminoácidos del extremo N-terminal de la DNA polimerasa Taq salvaje tuvo como resultado una DNA polimerasa totalmente activa. El documento también describe la construcción de un vector que consta de una secuencia de DNA que codifica la forma truncada, es decir, el fragmento Stoffel, y un codón de iniciación adicional que codifica metionina. Al utilizar el vector, la forma truncada de la DNA polimerasa Taq con un peso molecular aproximado de 61 kDa se expresó en *E. coli*. En el presente texto, el fragmento Stoffel (disponible comercialmente gracias a Applied Biosystems bajo el nombre de AmpliTaq DNA polymerase) de la DNA polimerasa Taq salvaje tal como se presenta en la patente estadounidense US 5 079 352 también recibe el nombre de TaqΔ289.

La patente estadounidense US 5 436 149 muestra un fragmento truncado enzimáticamente activo de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* que, no obstante, no posee los 279 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal. El fragmento se expresó en *E. coli* con dos codones adicionales que codifican una metionina (codón de iniciación) y un residuo de glicina, fusionado al patrón de lectura que codifica el aminoácido correspondiente al residuo 280 de la DNA polimerasa Taq salvaje. En el presente documento, el fragmento de la DNA polimerasa Taq salvaje tal como se describe en la patente estadounidense US 5 436 149 (también conocido como KlenTaqI comercializado por AB Peptides, Inc; y también como DNA polimerasa AdvanTaq comercializada por Clontech, Inc), también se denominará TaqΔ279. La actividad enzimática de la forma truncada se mantiene tras la exposición repetida a temperaturas de 99°C.

A la vista de la situación actual de esta biotecnología, existe la necesidad de disponer de una DNA polimerasa termoestable purificada que pueda utilizarse para mejorar los procesos de PCR descritos anteriormente y para mejorar los resultados obtenidos al utilizar una DNA polimerasa termoestable en otras técnicas recombinantes como la secuenciación de DNA u otros procesos de elongación de cebadores de DNA dependientes de un molde por la actividad de una DNA polimerasa.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que un fragmento de la DNA polimerasa salvaje de *Thermus aquaticus* (TaqWT) al que le faltan los 288 aminoácidos del extremo N-terminal (TaqΔ288) posee una mayor termoestabilidad en comparación con TaqWT, TaqΔ279 y TaqΔ289. Por tanto, la presente invención permite cubrir las necesidades descritas anteriormente al proporcionar TaqΔ288, vectores de expresión recombinantes que codifican el mismo o sus derivados, así como protocolos de purificación para TaqΔ288. La invención también abarca equipos que contienen TaqΔ288, así como la utilización de TaqΔ288 y equipos que contienen TaqΔ288. Además, la invención abarca métodos para la secuenciación de un molde de ácidos nucleicos y métodos para amplificar la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen una serie de términos.

Para la identificación de los aminoácidos se utilizan las abreviaciones de tres letras y el alfabeto de una sola letra de los aminoácidos, es decir, Asp D ácido aspártico, Ile I isoleucina, Thr T treonina, Leu L leucina, Ser S serina, Tyr Y tirosina, Glu E ácido glutámico, Phe F fenilalanina, Pro P prolina, His H histidina, Gly G glicina, Lys K lisina, Ala A alanina, Arg R arginina, Cys C cisteína, Trp W triptófano, Val V valina, Gln Q glutamina, Met M metionina y Asn N asparagina. Un aminoácido situado en una posición determinada en la secuencia de aminoácidos se representa por su abreviación de tres letras y un número. A modo de ejemplo y en referencia a la secuencia de aminoácidos de la DNA polimerasa Taq salvaje de ID. de SEC. núm.: 2, "Glu7" denota el residuo de ácido glutámico en la posición del aminoácido 7.

Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden utilizarse indistintamente y todas esas designaciones incluyen a su progenie. Por tanto, los términos "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula transformada inicialmente y los cultivos derivados de dicha célula sin tener en cuenta el número de transferencias. No toda la progenie ha de ser exactamente idéntica en el contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que posee la misma funcionalidad que se buscaba en la célula transformada inicial se incluye dentro de la definición de transformantes.

El término “secuencias control” se refiere a secuencias de DNA necesarias para la expresión en una célula huésped en particular de una secuencia codificante unida funcionalmente. Entre las secuencias control apropiadas para procariontes se encuentran, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosomas y posiblemente otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y estimuladores.

El término “sistema de expresión” se refiere a secuencias de DNA que contienen la secuencia codificante deseada y secuencias control unidas funcionalmente, de forma que los huéspedes transformados con esas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para llevar a cabo la transformación, el sistema de expresión debe incluirse en un vector; no obstante, el DNA relevante también puede ser integrado en el cromosoma huésped.

El término “gen” se refiere a una secuencia de DNA que consta de secuencias codificantes y de control necesarias para la producción de un polipéptido bioactivo recuperable o un precursor del mismo. El polipéptido puede estar codificado en su totalidad en la secuencia codificante, o únicamente una porción del mismo siempre y cuando mantenga su actividad enzimática.

Los términos “colocar en unión funcional” y “unido funcionalmente” se refieren a la posición de la secuencia codificante en la que las secuencias control funcionan dirigiendo la expresión de la proteína codificada en la secuencia codificante. Por tanto, una secuencia codificante “unida funcionalmente” a secuencias control se refiere a una configuración en la que la secuencia codificante puede ser expresada bajo la dirección de la secuencia control.

El término “detergentes poliméricos no iónicos” se refiere a agentes tensioactivos que no poseen carga iónica y que se caracterizan, con objeto de la presente invención, por su capacidad para estabilizar la Taq Δ 288 en un intervalo de pH de 3,5 a 9,5 aproximadamente, preferiblemente entre 4 y 8,5.

El término “oligonucleótido” tal como se utiliza aquí se define como una molécula que consta de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente más de tres y generalmente más de diez. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la función última o de la utilización del oligonucleótido. El oligonucleótido se puede obtener mediante síntesis o clonación.

El término “cebador” tal como se usa aquí se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se encuentra en las condiciones en las que se inicia la extensión del cebador. Un “cebador” oligonucleotídico puede ser de origen natural, como en el caso de las digestiones purificadas con enzimas de restricción, o se puede obtener mediante síntesis. La síntesis de un producto de la extensión de un cebador que es complementario a la cadena de ácidos nucleicos se inicia en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y de una enzima polimerasa termoestable en un tampón apropiado a la temperatura apropiada. Un “tampón” incluye cofactores (como iones metálicos divalentes) y sales (para proporcionar la fuerza iónica apropiada), ajustado al pH deseado.

Para una amplificación de máxima eficiencia, el cebador debe ser de una sola cadena, pero alternativamente puede ser de cadena doble. Si es de doble cadena, primero se trata al cebador para separar sus dos cadenas antes de utilizarse para preparar los productos de extensión. Generalmente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para iniciar la síntesis de los productos de extensión en presencia de la polimerasa. La longitud exacta de un cebador dependerá de muchos factores, como el origen del cebador y el resultado deseado, y la temperatura de la reacción debe ajustarse dependiendo de la longitud del cebador y de la secuencia de nucleótidos para garantizar una correcta alineación del cebador con el molde. En función de la complejidad de la secuencia diana, un oligonucleótido cebador contendrá típicamente de 15 a 35 nucleótidos. Generalmente, las moléculas cebadoras cortas necesitan temperaturas más bajas para formar complejos suficientemente estables con el molde.

Se selecciona un cebador que sea “sustancialmente” complementario a una cadena de la secuencia específica del molde. Un cebador debe ser lo suficientemente complementario para hibridar con la cadena molde y permitir la elongación del cebador. Una secuencia cebadora no debe presentar necesariamente la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, se puede unir al extremo 5' un fragmento de nucleótidos no complementario del cebador, manteniendo el resto de la secuencia sustancialmente complementaria a la cadena. Se pueden entremezclar en el cebador bases o secuencias más largas no complementarias, siempre y cuando el cebador tenga la complementariedad suficiente para hibridar con la secuencia molde y formar, así, un complejo cebador-molde que permita la síntesis del producto de elongación del cebador.

Los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas que cortan DNA de doble cadena en una secuencia de nucleótidos específica o cerca de la misma.

El término polipéptido “termoestable” con actividad DNA polimerasa se refiere a una enzima que se mantiene estable cuando se la somete a calor, al que también es resistente, y cataliza (facilita) la combinación de los nucleótidos en la forma apropiada para formar productos de extensión de cebadores que son complementarios a la cadena molde de ácidos nucleicos. Generalmente, la síntesis de un producto de extensión de un cebador empieza en el extremo 3' del cebador y continúa en dirección 5' a lo largo de la cadena molde hasta que termina la síntesis. Un ejemplo de DNA polimerasa termoestable es la DNA polimerasa Taq (TaqWT) o fragmentos delecionados de la misma como Taq Δ 279, Taq Δ 289 y la enzima aquí considerada, es decir, Taq Δ 288.

El ensayo de actividad DNA polimerasa utiliza un oligonucleótido de DNA en el que las secuencias terminales son ricas en G+C y capaces de hibridar entre ellas. Los oligonucleótidos forman un bucle cuando las secuencias terminales hibridan. La hibridación tiene como resultado una pequeña región de DNA de doble cadena que posee un extremo 5' que sobresale. Al mismo tiempo y en la cadena opuesta, se proporciona un extremo 3'-OH que sirve de sustrato a las DNA polimerasas. En presencia de dNTP e iones divalentes en la mezcla de reacción, y bajo condiciones que mantienen la actividad de la DNA polimerasa, una DNA polimerasa cataliza la elongación de la hebra a partir del extremo 3'-OH con nucleótidos complementarios a la cadena molde, que es la cadena con el extremo 5' protuberante. La reacción continúa hasta que el extremo 5' deja de sobresalir y se transforma en un extremo romo.

El ensayo se basa en el principio de fluorescencia por transferencia resonante de energía (FRET, en sus siglas en inglés), desencadenada por la actividad de la DNA polimerasa. Generalmente, como primer y segundo fluoróforo marcador se prefieren los que son capaces de interactuar para generar FRET.

Para la realización del ensayo se utiliza un oligonucleótido especial, tal y como se ha descrito anteriormente, que en su porción de doble cadena en una localización cercana a los nucleótidos que proporcionan inicialmente el extremo 5' protuberante de cadena sencilla, se sitúa un nucleótido o un análogo de nucleótido unido al primer fluoróforo. Preferentemente, el primer fluoróforo es la fluoresceína. Dentro del extremo de cadena sencilla 5' protuberante y aproximadamente a diez nucleótidos de la primera posición marcada con el fluoróforo se sitúa una adenina. En lugar de dTTP, la mezcla de reacción contiene dUTP marcado o una mezcla de dUTP marcado y sin marcar; el dUTP es capaz de incorporarse en la cadena opuesta para emparejarse con la adenina antes mencionada. Preferentemente, la molécula marcadora unida al dUTP como segundo fluoróforo es LightCycler-Red 640. Una vez que la actividad enzimática de la DNA polimerasa incorpora el dUTP marcado, los dos fluoróforos marcadores quedan próximos de manera que se permite la FRET. Los oligonucleótidos que han incorporado dUTP marcado se pueden valorar cuantificando la FRET mediante luz de una longitud de onda de excitación definida que es específica para la fluoresceína pero no para LightCycler-Red 640 y midiendo la luz emitida a la longitud de onda de emisión de LightCycler-Red 640 mediante un fluorímetro. Los expertos en la materia ya conocen bien este principio, igual que la metodología y los instrumentos para cuantificar la FRET.

Mediante el ensayo con FRET, los inventores compararon TaqWT, Taq Δ 289, Taq Δ 279 y Taq Δ 288, cada polimerasa expresada de forma recombinante en *E. coli*. En un lisado de los cultivos de expresión respectivos se valoró la termoestabilidad de la actividad DNA polimerasa. La actividad se determinó en los lisados antes y después de una incubación con calor a 97°C durante 35 min. Sorprendentemente se descubrió que debido al tratamiento con calor la actividad DNA polimerasa de TaqWT, Taq Δ 289 y Taq Δ 279 disminuyó hasta menos de un 50%: Taq Δ 279 mantuvo una actividad entre alrededor del 30 y menos del 50%, Taq Δ 289 entre el 15 y el 30% y TaqWT entre el 0 y el 5%. En contraste, Taq Δ 288 expresada con una metionina terminal mantenía su actividad entre alrededor del 50 y el 80%.

Mediante el mismo ensayo de actividad con FRET, se compararon TaqWT y Taq Δ 288 como enzimas purificadas en una mezcla de reacción para PCR. Tras la incubación con calor a 98°C durante 30 min, TaqWT mantuvo su actividad entre alrededor del 10 y el 15%. En contraste, Taq Δ 288 mantuvo su actividad entre alrededor del 30 y el 35%.

Mediante el mismo ensayo de actividad con FRET, se compararon TaqWT, Taq Δ 279 y Taq Δ 288 como enzimas purificadas en una preparación estabilizada, es decir, un tampón de almacenamiento que contiene un 50% de glicerol. TaqWT, Taq Δ 279 y Taq Δ 288 se guardaron en el mismo tampón de almacenamiento. Tras la incubación con calor a 98°C durante 30 min, TaqWT mantuvo su actividad entre alrededor del 40 y el 50%. Taq Δ 279 mantuvo su actividad entre alrededor del 80 y el 100%. Taq Δ 288 mantuvo su actividad entre alrededor del 90 y el 100%.

La termoestabilidad de Taq Δ 288 con la metionina N-terminal y sin ella apenas muestra diferencias.

Una primera realización de la invención es un polipéptido con actividad DNA polimerasa, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido es la secuencia de aminoácidos de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) a la que le faltan los 288 aminoácidos del extremo N-terminal de la DNA polimerasa Taq. En el presente documento dicho polipéptido también recibe el nombre de Taq Δ 288. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es la secuencia de aminoácidos de ID. de SEC. núm.: 2.

El polipéptido de acuerdo con la invención puede obtenerse utilizando más de un método. Por ejemplo, el polipéptido se puede obtener de una célula huésped transformada que exprese el polipéptido de forma recombinante. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos del polipéptido está gobernada por los codones del patrón de lectura abierto que codifica el polipéptido. Un patrón de lectura abierto funcional necesita un codón de iniciación que codifica un residuo de metionina N-terminal. Por tanto, en otra realización de la invención la secuencia de aminoácidos del polipéptido posee adicionalmente un residuo de metionina N-terminal. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es la secuencia de aminoácidos del ID. de SEC. núm.: 4. En el presente documento, los polipéptidos con ID. de SEC. núms.: 2 y 4 se denominan Taq Δ 288.

Preferiblemente, se mejora la termoestabilidad del polipéptido cuando se compara con la enzima nativa, es decir, la DNA polimerasa Taq con la secuencia de aminoácidos original (TaqWT) representada por el ID. de SEC. núm.: 7. También se prefiere la mejora de la termoestabilidad cuando se compara con los fragmentos delecionados Taq Δ 289 y Taq Δ 279. Los inventores han descubierto que cuando Taq Δ 288 (con una metionina N-terminal), Taq Δ 289, Taq Δ 279

y TaqWT se expresan de forma recombinante en *E. coli* y bajo las mismas condiciones, TaqΔ288 presenta la mayor termoestabilidad respecto a todos los demás.

Otra realización de la invención es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención. Los expertos en la materia reconocerán que un polipéptido con actividad DNA polimerasa y una mayor termoestabilidad de acuerdo con la invención se construye muy fácilmente mediante técnicas de DNA recombinante. En una realización preferida de la invención, la secuencia de nucleótidos es la secuencia de nucleótidos con ID. de SEC. núms.: 1 y 3.

Asimismo, el experto en la materia conoce cambios silentes de codón (es decir, el aminoácido codificado no cambia) que pueden introducirse en la secuencia de nucleótidos que codifican los primeros entre 10 y 20 residuos en el extremo N-terminal del polipéptido y que no afectan a la secuencia del polipéptido. Dichos cambios pueden provocar la aparición de una secuencia de nucleótidos optimizada y pueden provocar un incremento de la producción del polipéptido de acuerdo con la invención en células huésped transformadas, como *E. coli*, o en un sistema de expresión libre de células. Se pueden obtener otras secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican un polipéptido de la invención introduciendo cambios silentes de codón en la secuencia codificante completa. Esto puede ser particularmente útil si el polipéptido se va a expresar en una célula huésped procariota de, p. ej., el género *Bacillus*; o en una célula huésped eucariota como una levadura, preferentemente en levaduras metilotróficas.

Para construir el vector de expresión, se obtiene un DNA que codifica el polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la invención, una fusión del polipéptido con una secuencia adicional que no destruya la actividad o una secuencia adicional escindible bajo condiciones controladas (como el tratamiento con peptidasa) para obtener la proteína activa. Entonces, la secuencia codificante se coloca unida funcionalmente a secuencias control apropiadas en un vector de expresión. Así, otra realización de la invención es un vector de DNA recombinante que consta de una secuencia de DNA de acuerdo con la invención.

El vector se utiliza para transformar una célula huésped apropiada, y la célula huésped transformada se cultiva bajo condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido recombinante con actividad DNA polimerasa. El vector puede diseñarse para que se replique de forma autónoma en la célula huésped o para que se integre en el DNA cromosómico de la célula huésped.

Cada uno de los pasos antes mencionados puede hacerse de muchas maneras. Por ejemplo, la secuencia codificante deseada se puede obtener a partir de fragmentos genómicos y utilizarse directamente en huéspedes apropiados. La construcción de vectores de expresión funcionales en una variedad de huéspedes se realiza utilizando replices apropiados y secuencias control, tal y como se expone a continuación. Para la construcción de vectores apropiados que contengan las secuencias codificante y de control se utilizan técnicas estándar de restricción y ligación que se conocen bien en el campo. Plásmidos aislados, secuencias de DNA o oligonucleótidos sintéticos se escinden, modifican y religan en la forma deseada. Se pueden añadir, si no se encuentran normalmente, sitios de restricción en los extremos de la secuencia codificante de manera que se facilite la construcción de un vector de expresión, como se ejemplifica más adelante.

Se encuentran disponibles una serie de métodos de mutagénesis dirigida por cebadores para aquellas regiones de vectores o de secuencias codificantes que necesiten modificaciones en la secuencia. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede utilizar para realizar mutagénesis dirigida. En otra técnica ahora estándar en el ámbito, se utiliza un oligonucleótido sintético que codifica la mutación deseada como cebador para dirigir la síntesis de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria de un vector de cadena única, como pBS13+, que sirve como molde para la construcción de un producto de extensión del cebador causante de la mutagénesis. El DNA sometido a mutagénesis se utiliza para transformar una bacteria huésped y los cultivos de las bacterias transformadas se siembran y se identifican. La identificación de vectores modificados puede implicar la transferencia de DNA de transformantes seleccionados a un filtro de nitrocelulosa u otra membrana y la hibridación del material transferido con un cebador sintético tratado con quinasas a una temperatura que permita la hibridación del complementario exacto de la secuencia modificada pero impida la hibridación con la cadena original. Entonces, los transformantes que contienen DNA que híbrida con la sonda se cultivan y sirven como reserva de DNA modificado.

Los expertos en la materia también conocen vectores de expresión que permiten la construcción mediante técnicas recombinantes de polipéptidos de fusión que contienen la denominada "cola de histidinas". Una cola de polihistidina es una secuencia de aminoácidos que contiene preferiblemente 6 histidinas consecutivas. La cola de histidinas se fusiona generalmente al extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido deseado. Se facilita la purificación de dicho polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad usando metales retenidos en la que los polipéptidos con cola de polihistidina se adsorben a iones metálicos retenidos en resinas quelantes de metales. Un ejemplo es el sistema de purificación QIAexpress de Qiagen. La misma empresa proporciona un vector de expresión (pQE) que puede utilizarse para producir polipéptidos de fusión con cola de polihistidina.

Sin embargo, no se desea necesariamente que la cola de histidinas forme parte del polipéptido purificado con actividad DNA. Con esa finalidad, se puede insertar una secuencia adicional que proporciona un lugar de escisión por proteasas entre la cola de histidinas y el polipéptido deseado. Un ejemplo muy conocido es una secuencia que proporciona un sitio de escisión para una proteasa, el factor X. Así, otra realización de la invención es un vector de DNA recombinante que consta de una secuencia de DNA de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la secuencia

de DNA codifica un polipéptido de fusión que consta de (i) un cola terminal de histidinas; (ii) una secuencia de aminoácidos que proporciona un sitio de escisión para la proteasa factor X adyacente a la cola de histidinas; y (iii) el polipéptido de acuerdo con la invención. Se entiende que el sitio de escisión para la proteasa factor X en el polipéptido de fusión es capaz de ser reconocido y escindido por una proteína con actividad proteasa sobre el factor X. Se prefiere más que la secuencia de DNA codifique un polipéptido de fusión que posea la secuencia de aminoácidos de ID. de SEC. núm.: 5.

Cuando se desea producir un polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la invención o un derivado del mismo como un polipéptido de fusión, la producción de una forma recombinante del polipéptido generalmente implica la construcción de un vector de expresión, que es un vector de DNA recombinante; la transformación de una célula huésped con el vector; y el cultivo de las células huésped transformadas bajo condiciones en las que dicha expresión pueda suceder. Así, otra realización de la invención es una célula huésped recombinante transformada con un vector de DNA recombinante de acuerdo con la invención.

Las secuencias control, los vectores de DNA recombinante y los métodos de transformación dependen del tipo de célula huésped utilizado para expresar el gen. Generalmente, se utilizan como huéspedes células de mamífero, de insecto, de levaduras o microorganismos procariotas. Generalmente, los huéspedes procariotas son los más eficientes y convenientes para la producción de proteínas recombinantes y, por tanto, se prefieren para la expresión de un polipéptido o una proteína de fusión de la presente invención.

El procariota utilizado con más frecuencia para expresar proteínas recombinantes es *E. coli*. Los expertos en la materia conocen las numerosas cepas de *E. coli* y los sistemas de expresión que pueden utilizarse para poner en práctica la presente invención. Sin embargo, también se pueden utilizar otras cepas microbianas diferentes de *E. coli*, como bacilos, por ejemplo *Bacillus subtilis*, diversas especies de *Pseudomonas*, y otras cepas bacterianas para la expresión recombinante de DNA polimerasas termoestables de la presente invención. En dichos sistemas procariotas, generalmente se utilizan vectores tipo plásmidos que contienen sitios de replicación y secuencias control del huésped o de una especie compatible con el huésped.

Además de las bacterias, también se pueden utilizar como células huésped recombinantes microorganismos eucariotas como las levaduras. Por tanto, también se puede producir un polipéptido o una proteína de fusión de acuerdo con la invención utilizando, preferiblemente, una levadura metilotrófica como microorganismo huésped eucariota. Las levaduras metilotróficas poseen las vías bioquímicas necesarias para la utilización del metanol y se clasifican en cuatro géneros, en función de las características de la morfología celular y del crecimiento: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*. Los sistemas más desarrollados basados en huéspedes metilotróficos utilizan *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). La expresión de proteínas heterólogas en levaduras se describe en las patentes estadounidenses núms. US 5 618 676, US 5 854 018, US 5 856 123 y US 5 919 651.

También se pueden utilizar secuencias terminadoras para estimular la expresión cuando se colocan en el extremo 3' de la secuencia codificante. En genes procedentes de levaduras, dichos terminadores se localizan en la región 3' no traducida tras las secuencias codificantes. Cualquier vector que contiene un promotor, origen de replicación u otras secuencias control compatibles con levaduras es apropiado para construir vectores de expresión en levaduras para las DNA polimerasas termoestables de la presente invención.

Además, las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido con actividad DNA polimerasa, o un polipéptido de fusión que lo contiene de acuerdo con la presente invención, también pueden expresarse en cultivos de células huésped eucariotas procedentes de organismos multicelulares.

En función de las células huésped utilizadas, la transformación se realiza mediante técnicas estándar apropiadas a dichas células. El tratamiento con calcio mediante cloruro cálcico, tal y como se describe en Cohen, S.N., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 2110-2114, se utiliza en células procariotas u otros tipos celulares que posean paredes celulares que supongan una barrera sustancial.

Se utiliza la infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Shaw, C.H., *et al.*, Gene 23 (1983) 315-330) en determinadas células vegetales. En el caso de las células de mamífero, se prefiere el método de precipitación por fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology 52 (1978) 546. La transformación de levaduras se lleva a cabo de acuerdo con el método de van Solingen, P. y Plaat, J.B., J. Bact. 130 (1977) 946-947 y Hsiao, C.L. y Carbon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 3829-3833.

Otra realización de la invención es un método para producir un polipéptido con actividad DNA polimerasa que consta de los siguientes pasos: (a) la transformación de una célula huésped con un vector de DNA de acuerdo con la invención; (b) el cultivo de las células huésped y la expresión en dichas células huésped del polipéptido con actividad DNA polimerasa; y (c) la purificación del polipéptido con actividad DNA polimerasa expresado en el paso (b). La purificación del polipéptido expresado mediante técnicas recombinantes se consigue de forma similar que el TaqWT expresado de forma recombinante (US 5 079 352) o fragmentos delecionados del mismo (US 5 616 494; US 5 436 149), excepto que se obtiene TaqΔ288. Se prefiere más un método para producir un polipéptido con actividad DNA polimerasa que consta de los siguientes pasos: (a) la transformación de una célula huésped con un vector de DNA de acuerdo con la invención; (b) el cultivo de las células huésped y la expresión en dichas células huésped de un polipéptido de fusión que consta de (i) un cola de histidinas terminal, (ii) una secuencia de aminoácidos que proporciona un

sitio de escisión para la proteasa factor X adyacente a la cola de histidinas y (iii) el polipéptido de acuerdo con la invención; (c) la purificación del polipéptido con actividad DNA polimerasa expresado en el paso (b); (d) la escisión del polipéptido de fusión al incubar dicho polipéptido de fusión en presencia de una proteasa con actividad proteolítica del factor X, que separa al polipéptido con actividad DNA polimerasa del sitio de escisión para la proteasa factor X y de la cola de histidinas; (e) la purificación del polipéptido con actividad DNA polimerasa del paso (d). Se prefiere aún más que en el paso (c) se purifique la proteína de fusión utilizando una matriz de afinidad de partículas capaz de unirse a la cola de histidinas. Se prefiere aún más que en el paso (d) la cola de histidinas se encuentre unida a la matriz de afinidad particulada. Es aún más preferido que la matriz de afinidad particulada sea un material de cromatografía cubierto de una resina quelante de metales, y que los iones metálicos se encuentren retenidos en el material de cromatografía recubierto. Es todavía más preferido que el material de cromatografía esté recubierto con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). En ese sentido, los expertos en la materia conocen la patente EP 1 069 131. Así, una manera preferida de aislar un polipéptido de fusión con cola de histidina de acuerdo con la invención que se ha expresado de forma recombinante en un cultivo de células transformadas de *E. coli* consiste en preparar un lisado de células. Una manera de preparar un lisado consiste en suspender las células en un tampón de lisis y tratar las células con ultrasonidos. El DNA presente en el lisado se digiere con desoxirribonucleasa, preferentemente desoxirribonucleasa I. Posteriormente, las proteínas de *E. coli* se degradan mediante desnaturalización por calor (30 min, 72°C, preferiblemente) y pueden separarse del lisado por centrifugación. Tras la centrifugación, el sobrenadante transparente se analiza por cromatografía utilizando una columna Ni-NTA Superflow (Catálogo Qiagen núms. 30 410, 30 430 o 30 450), en la que el polipéptido de fusión con cola de histidina se une a la matriz de afinidad de metales retenidos de la columna. Tras dos pases con tampón de lavado, se aplica un gradiente de tampón de lavado y tampón de elución, de manera que el tampón de elución reemplaza gradualmente el tampón de lavado en el gradiente. De ese modo el polipéptido de fusión con cola de histidina puede ser eluido de la columna. Posteriormente, el polipéptido de fusión eluido se incuba en presencia de la proteasa factor X bajo condiciones que permitan la actividad proteolítica específica de la proteasa factor X. Tras la desnaturalización por calor (30 min, 72°C, preferentemente), el producto (es decir, TaqΔ288) se separa de las colas de histidina escindidas y de los polipéptidos de fusión no escindidos mediante otra cromatografía en columna Ni-NTA Superflow. Se recogen las fracciones de líquido de la columna que contienen el producto. Entre otras etapas posteriores se encuentran los procesos de concentración y diálisis, preferiblemente frente a un tampón que mantiene la estabilización de TaqΔ288 dando lugar a la preparación estabilizada del polipéptido de acuerdo con la invención.

Alternativamente, el polipéptido de fusión puede ser escindido mediante la proteasa factor X cuando se une a la matriz de afinidad con metales retenidos de la columna. En ese caso, el material de la columna al que se une el polipéptido de fusión se incuba en presencia de la proteasa factor X bajo condiciones que permitan la actividad proteolítica específica de la proteasa factor X. Los lavados posteriores con un tampón que no es el tampón de elución, p. ej. un tampón que permite la unión de la cola de histidina al material de cromatografía recubierto por Ni-NTA, darán como resultado el polipéptido TaqΔ288 en la fracción, junto con la proteasa factor X. Posteriormente, la proteasa factor X se inactiva y el polipéptido TaqΔ288 se purifica.

Para una estabilidad a largo plazo, las DNA polimerasas de la presente invención se pueden almacenar en un tampón que contiene uno o más detergentes poliméricos no iónicos. Generalmente, dichos detergentes son aquellos que poseen un peso molecular dentro del intervalo aproximado de 100 a 250 000 daltons, preferiblemente alrededor de 4 000 a 200 000 daltons, y estabilizan la enzima a pH entre 3,5 y 9,5 aproximadamente, preferiblemente entre 4 y 8,5. Entre los ejemplos de dichos detergentes se encuentran los especificados en las páginas 295-298 del McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, edición norteamericana (1983), publicado por la McCutcheon Division de MC Publishing Co., 175 Rock Road, Glen Rock, NJ (EE. UU.).

Preferiblemente, los detergentes se seleccionan del grupo formado por éteres y lauriléteres de alcoholes grasos etoxilados, alquilfenoles etoxilados, compuestos de etanol polietoxi octilfenoxilados, alcoholes de cadena lineal modificados oxietilados o oxipropilados, monooleatos de polietilenglicol, polisorbatos y éteres de alcoholes grasos fenólicos. En concreto, se prefieren especialmente el Tween 20, un monolaurato de sorbitán etoxilado (20) de ICI Americas Inc., Wilmington, DE; e Iconol NP-40, un alquilfenol (nonilo) etoxilado de BASF Wyandotte Corp., Parsippany, NJ.

Otra realización de la invención es una preparación estabilizada que consta de un polipéptido de acuerdo con la invención en un tampón que contiene uno o más detergentes poliméricos no iónicos. Preferiblemente, el tampón de la preparación estabilizada contiene componentes seleccionados del grupo formado por: glicerol, KCl, Tris/HCl (hidrocloruro de tris(hidroximetil)-aminometano), EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético), Tween 20 y ditiotreitól (DTT). Se prefiere aún más que la preparación estabilizada contenga un 63% (peso por volumen) de glicerol, KCl 100 mM, Tris/HCl 20 mM pH 8,5, EDTA 0,1 mM, 0,5% (volumen por volumen) de Tween 20 y DTT 1 mM.

En cada ciclo de amplificación de la PCR, se desnaturaliza una secuencia diana de doble cadena, los cebadores hibridan con cada una de las cadenas de la diana desnaturalizada y se extienden los cebadores por la acción de la DNA polimerasa. La especificidad de la amplificación depende de la especificidad de la hibridación del cebador. Los cebadores se seleccionan para que sean complementarios o sustancialmente complementarios a las secuencias presentes en el extremo 3' de cada cadena de la secuencia diana de ácidos nucleicos. En las condiciones de temperatura elevada utilizadas en una PCR típica, los cebadores únicamente hibridan con la secuencia diana escogida. No obstante, las mezclas de reacción para la amplificación generalmente se preparan a temperatura ambiente, muy por debajo de la temperatura necesaria para garantizar la especificidad de la hibridación del cebador. Bajo estas condiciones de menor astringencia, los cebadores pueden unirse de forma no específica a otras secuencias de ácidos nucleicos solo

parcialmente complementarias (o incluso a otros cebadores) e iniciar la síntesis de productos de extensión no deseados que pueden amplificarse junto con la secuencia diana. La amplificación de productos de extensión del cebador no específicos puede competir con la amplificación de las secuencias diana deseadas y puede disminuir significativamente la eficiencia de amplificación de la secuencia deseada. Los problemas provocados por la amplificación no específica se discuten en mayor detalle en Chou, Q., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 1717-1723.

Antes de iniciar la reacción se puede reducir la amplificación no específica disminuyendo la formación de productos de extensión a partir de cebadores unidos a secuencias no diana. En un método, denominado protocolo de "inicio en caliente", algunos reactivos no se añaden a la mezcla de reacción hasta que la temperatura aumenta lo suficiente como para ofrecer la especificidad de hibridación necesaria. De este modo, la mezcla de reacción no puede llevar a cabo la extensión de los cebadores hasta el momento en el que las condiciones de reacción garanticen la hibridación específica de los cebadores.

Es frecuente que en los protocolos de "inicio en caliente" se evite la actividad de la DNA polimerasa de la mezcla de reacción mediante una inactivación reversible de la DNA polimerasa, es decir, mediante el bloqueo reversible de la DNA polimerasa. Un método utiliza una DNA polimerasa modificada químicamente que se activa únicamente después de su incubación durante un periodo de tiempo determinado a temperatura elevada evitando, así, la producción de productos de síntesis de DNA no deseados durante la preparación de la mezcla de reacción de la PCR. La patente estadounidense US 6 183 998 describe la inactivación reversible de DNA termoestable utilizando un aldehído como el formaldehído. Esencialmente, se consigue la inactivación completa de la enzima a temperatura ambiente con una recuperación de la actividad enzimática a temperaturas superiores a 50°C. La patente europea EP 0 771 870 y la patente estadounidense US 6 479 264 describen la inactivación reversible de DNA polimerasas termoestables utilizando un anhídrido de ácido dicarboxílico. Las patentes estadounidenses US 5 773 258 y US 5 677 152 describen la inactivación reversible de la actividad enzimática de una enzima termoestable. Entre los reactivos preferidos para la modificación covalente se encuentran los siguientes: anhídrido maleico, anhídridos maleicos sustituidos como el anhídrido citracónico, el anhídrido cis-aconítico, y el anhídrido 2,3-dimetilmaleico; anhídrido exo-cis-3,6-endoxo-delta 4-tetrahidroftálico; y anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico. Por consiguiente, los anhídrido citracónico y cis-aconítico se prefieren para la preparación de DNA polimerasas bloqueadas reversiblemente para su utilización en amplificaciones por PCR. La enzima inactivada reversiblemente es el resultado de una modificación química de la proteína que provoca la inactivación de la enzima. La actividad de la enzima inactivada se recupera mediante la incubación de la mezcla de reacción a temperaturas elevadas antes de la reacción de amplificación o como parte de ella. Así, en otra realización preferida de la invención, el polipéptido de acuerdo con la presente invención se une covalentemente a un compuesto capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une covalentemente a dicho polipéptido. Aún se prefiere más que los compuestos se seleccionen del grupo formado por: (a) anhídrido citracónico, (b) anhídrido cis-aconítico, (c) anhídrido 2,3-dimetilmaleico, (d) anhídrido exo-cis-3,6-endoxo-delta 4-tetrahidroftálico y (e) anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico.

Otra realización preferida de la invención es una preparación estabilizada que consta de un polipéptido con actividad DNA polimerasa que se encuentra unido covalentemente a un compuesto capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une covalentemente a dicho polipéptido. Se prefiere más que los compuestos se seleccionen del grupo formado por (a) anhídrido citracónico, (b) anhídrido cis-aconítico, (c) anhídrido 2,3-dimetilmaleico, (d) anhídrido exo-cis-3,6-endoxo-delta 4-tetrahidroftálico y (e) anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico.

Sin embargo, otra realización preferida de la invención es una preparación estabilizada que consta de un polipéptido con actividad DNA polimerasa que se encuentra unido a un anticuerpo capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une a dicho polipéptido. La actividad DNA polimerasa también se puede bloquear reversiblemente mediante una modificación no covalente de la DNA polimerasa. La patente estadounidense US 5 338 671 describe la utilización de anticuerpos específicos de la enzima DNA polimerasa para inhibir la actividad de la DNA polimerasa. La mezcla previa de DNA polimerasa y de anticuerpos específicos frente a la DNA polimerasa dan lugar a la formación de complejos anticuerpo-polimerasa. Bajo estas condiciones no se puede detectar sustancialmente ninguna actividad de extensión. A temperaturas elevadas, el anticuerpo se disocia del complejo liberando, así, la DNA polimerasa que puede entonces realizar la síntesis de DNA durante la PCR. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal frente a la DNA polimerasa Taq. Los anticuerpos monoclonales frente a la DNA polimerasa Taq se conocen en el ámbito y se encuentran descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense US 5 338 671. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales frente a la DNA polimerasa Taq son TP4-9.2 y TP-12.2 que pueden obtenerse de hibridomas depositados en la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC) y denominados con los números de ATCC HB11807 y HB11127, respectivamente. Los anticuerpos que se prefieren poseen una constante de asociación con la polimerasa de al menos cerca de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos definidos como específicos para la DNA polimerasa son aquellos anticuerpos que son capaces de inhibir la actividad enzimática de la DNA polimerasa a temperaturas entre 20 y 40°C. Los anticuerpos de la invención también pueden inactivarse por las temperaturas elevadas utilizadas mediante los ciclos térmicos de la PCR y la preincubación de la mezcla de reacción de la PCR a temperaturas elevadas antes de iniciar los ciclos térmicos. La capacidad de los anticuerpos para inhibir la actividad enzimática de la polimerasa puede ser determinada mediante ensayos conocidos por los expertos en la materia, tal y como se describe, por ejemplo, en Sharkey, D.J., *et al.*, *Biotechnology* 12 (1994) 506-509. Por ejemplo, los ensayos estándar para valorar la actividad enzimática de las DNA polimerasas pueden basarse en la capacidad de la polimerasa para incorporar 3H-dNTP en gaps presentes en solo una de las cadenas hechos en el DNA. La capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad de la polimerasa se determina preincubando el anticuerpo con la polimerasa y llevando a cabo el ensayo estándar de

la polimerasa. Los anticuerpos capaces de disminuir significativamente la actividad polimerasa en dichos ensayos son útiles para la presente invención. Se pueden utilizar ensayos similares para determinar si los anticuerpos deseados se inactivan por calor. Brevemente, el ensayo para valorar la capacidad del anticuerpo para inhibir la polimerasa se modifica aumentando la temperatura deseada seguido de un enfriamiento y del ensayo de la actividad polimerasa. Los anticuerpos deseados se inactivan con temperaturas entre 85 y 95°C, liberando, así, la polimerasa activa.

Otra realización de la invención consiste en la utilización de un polipéptido de acuerdo con la invención, del polipéptido de acuerdo con la invención unido covalentemente a un compuesto capaz de bloquear reversiblemente la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se encuentra covalentemente unido a él, del polipéptido de acuerdo con la invención unido a un anticuerpo capaz de bloquear reversiblemente la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une a él, o de una preparación estabilizada de acuerdo con la invención, para producir productos de extensión de cebadores. Los productos de extensión de los cebadores se producen, p. ej., cuando se lleva a cabo una PCR o una reacción de secuenciación utilizando el método Sanger. Así, se prefiere su utilización de acuerdo con la invención para la secuenciación de moldes de ácidos nucleicos. También se prefiere su utilización de acuerdo con la invención para la amplificación de ácidos nucleicos diana. Otro ejemplo de extensión de cebadores es la traslación de mellas. El experto en la materia conoce una serie de ejemplos que ilustran la expresión “producción de productos de extensión de cebadores”. La invención abarca la producción de productos de extensión de cebadores utilizando un polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la invención o una preparación que lo contenga.

Otra realización de la invención es un equipo para obtener productos de la extensión de cebadores que consta de una preparación estabilizada de acuerdo con cualquiera de las de la invención. Se prefiere un equipo para secuenciar un molde de ácidos nucleicos. También se prefiere un equipo para amplificar un ácido nucleico diana. Se prefiere mucho más un equipo para amplificar un ácido nucleico diana utilizando el LightCycler. Un ejemplo del mismo es el equipo LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, núm. de catálogo 2015099). Por consiguiente, dicho equipo puede constar de tres viales. Uno de ellos (1) contiene una mezcla de reacción concentrada 10x que contiene una preparación estabilizada de TaqΔ288 o TaqΔ288 con la actividad DNA polimerasa bloqueada reversiblemente, y adicionalmente una mezcla de dNTP, opcionalmente con dUTP en lugar de dTTP, colorante verde SYBR I y MgCl₂ 10 mM. Otro vial del equipo (2) contiene una solución madre de MgCl₂ a una concentración de, p. ej., 25 mM. Otro vial del equipo (3) contiene agua estéril y purificada de grado PCR para ajustar el volumen de reacción final.

Otra realización de la invención es un método para amplificar un ácido nucleico diana presente en una muestra que consta de los siguientes pasos: (a) poner en contacto dicha muestra con una mezcla de reacción de amplificación que contiene un cebador complementario a dicho ácido nucleico diana y un polipéptido seleccionado del grupo formado por (i) un polipéptido de acuerdo con la invención, (ii) un polipéptido de acuerdo con la invención unido covalentemente a un compuesto capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se encuentra unido a él y (iii) un polipéptido de acuerdo con la invención unido a un anticuerpo capaz de bloquear de forma reversible la actividad de DNA polimerasa del polipéptido cuando se encuentra unido a él; (b) opcionalmente, liberar la actividad DNA polimerasa bloqueada mediante tratamiento con calor; (c) hibridar en la mezcla resultante del paso (a) dicho cebador con el ácido nucleico diana; (d) amplificar el ácido nucleico diana incubando la mezcla tras el paso (b) para permitir la formación de los productos de extensión de los cebadores.

Para facilitar la discusión, el protocolo especificado posteriormente asume que la secuencia específica que debe ser amplificada se encuentra en forma de ácido nucleico de doble cadena. Sin embargo, el proceso es igualmente útil para amplificar ácidos nucleicos de una sola cadena, como el RNA, aunque en la realización preferida el producto final es también un DNA de doble cadena. En la amplificación de un ácido nucleico de una sola cadena, el primer paso implica la síntesis de una cadena complementaria (se puede utilizar uno de los dos cebadores de amplificación con esa finalidad), y los pasos posteriores se realizan como se describirá más adelante para el proceso de amplificación de secuencias de doble cadena.

Así, un ejemplo de proceso de amplificación consta de los siguientes pasos: (a) poner en contacto cada cadena de ácidos nucleicos con cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y dos oligonucleótidos cebadores para cada una de las secuencias específicas que se van a amplificar, escogiéndose cebadores que sean sustancialmente complementarios a las hebras diferentes de la secuencia específica, de manera que el producto de extensión sintetizado a partir de cada cebador puede servir como molde para producir productos de extensión del segundo cebador una vez separado de su cadena complementaria, y dicho contacto debe establecerse a una temperatura que permita la hibridación de cada cebador con la hebra complementaria de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto cada hebra de ácidos nucleicos, al mismo tiempo que (a) o después, con un polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la presente invención que permita la combinación de nucleósidos trifosfato para formar productos de extensión de cebadores complementarios a cada hebra de la secuencia específica de ácidos nucleicos; (c) mantener la mezcla del paso (b) a una temperatura eficaz durante el tiempo suficiente para promover la actividad del polipéptido con actividad DNA polimerasa y para sintetizar, para cada una de las secuencias que se quieren amplificar, un producto de extensión de cada cebador que es complementario a cada una de las hebras del ácido nucleico molde, pero que no sea lo suficientemente elevada para separar cada producto de extensión de la hebra complementaria molde; (d) calentar la mezcla del paso (c) durante el tiempo suficiente y a una temperatura eficaz para separar los productos de extensión de los cebadores de los moldes en los que se sintetizaron para producir moléculas de una sola cadena, pero que no sea lo suficientemente alta como para desnaturalizar de forma irreversible la enzima; (e) enfriar la mezcla del paso (d) durante un tiempo suficiente y a una temperatura eficaz que promueva la hibridación de un cebador con cada una de las moléculas de una sola

cadena producidas en el paso (d); y (f) mantener la mezcla del paso (e) a una temperatura eficaz y el tiempo suficiente para permitir la actividad DNA polimerasa del polipéptido y sintetizar, para cada secuencia diferente que se quiera amplificar, un producto de extensión de cada cebador que es complementario a cada ácido nucleico molde producido en el paso (d), pero que no sea lo suficientemente elevada como para separar cada producto de extensión de la hebra molde complementaria. Las temperaturas efectivas y los tiempos suficientes en los pasos (e) y (f) pueden coincidir, de manera que los pasos (e) y (f) pueden llevarse a cabo de forma simultánea. Los pasos (d)-(f) se repiten hasta que se alcanza el nivel deseado de amplificación.

El método de amplificación no es solo útil para producir grandes cantidades de una secuencia específica de ácidos nucleicos de secuencia conocida, sino que también es útil para obtener secuencias de ácidos nucleicos que se sabe que existen pero que no se encuentran completamente especificadas. Únicamente es necesario conocer un número suficiente de bases a ambos extremos de la secuencia en suficiente detalle de manera que se puedan preparar dos oligonucleótidos cebadores que hibridarán con las distintas hebras de la secuencia deseada en posiciones relativas a lo largo de la secuencia, de manera que el producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, cuando se separa de su molde (complementario), puede servir como molde para la extensión de otro cebador dentro de una secuencia de ácidos nucleicos de longitud definida. Cuanto mayor es el conocimiento sobre las bases situadas a ambos extremos de la secuencia, mayor puede ser la especificidad de los cebadores por la secuencia de ácidos nucleicos diana, la eficiencia del proceso y la especificidad de la reacción.

En cualquier caso, debe estar disponible una copia inicial de la secuencia a amplificar, aunque no es necesario que la secuencia sea pura o una molécula discreta. En general, el proceso de amplificación implica una reacción en cadena para producir, en cantidades exponenciales relativas al número determinado de pasos de la reacción, al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica siempre que (a) los extremos de la secuencia considerada se conozcan en suficiente detalle para poder sintetizar oligonucleótidos que hibriden con ellos y que (b) se encuentre disponible una pequeña cantidad de la secuencia para iniciar la reacción en cadena. El producto de la reacción en cadena puede ser un ácido nucleico de cadena doble discreto con extremos correspondientes a los extremos 5' de los cebadores específicos utilizados.

Cualquier secuencia de ácidos nucleicos, ya esté purificada o no, se puede utilizar como ácido nucleico inicial, siempre y cuando contenga (o se sospeche que contenga) la secuencia de ácidos nucleicos específica que se quiere amplificar. Los ácidos nucleicos a amplificar se pueden obtener de cualquier fuente; por ejemplo, de plásmidos como pBR322, DNA o RNA clonado, o de DNA o RNA natural de cualquier origen, incluyendo bacterias, levaduras, virus, orgánulos y organismos superiores como plantas y animales. El DNA o RNA se puede extraer de la sangre, tejidos como las vellosidades coriónicas, o de células amnióticas mediante diversas técnicas. Véase, p. ej., Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982, pp. 280-281. Así, en el proceso se puede utilizar por ejemplo DNA o RNA, incluyendo RNA mensajero, y el DNA y el RNA pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Además, se puede utilizar un híbrido DNA-RNA que contenga una hebra de cada. También se puede utilizar una mezcla de cualquiera de estos ácidos nucleicos dado que los ácidos nucleicos pueden provenir de una reacción de amplificación previa (utilizando los mismos cebadores u otros diferentes). La secuencia de ácidos nucleicos a amplificar puede ser únicamente una porción de una molécula grande o puede encontrarse inicialmente como una molécula discreta, de manera que la secuencia específica constituye el ácido nucleico completo.

No es necesario que la secuencia a amplificar se encuentre inicialmente en forma pura; la secuencia puede constituir una fracción menor de una mezcla compleja, como puede ser una porción del gen de la β -globina del DNA humano completo (como se ilustra en Saiki, R.K., *et al.*, Science 230 [1985] 1350-1354) o una porción de una secuencia de ácidos nucleicos de un microorganismo particular que puede constituir solo una fracción menor de una muestra biológica determinada. Las células pueden utilizarse directamente en el proceso de amplificación tras su suspensión en un tampón hipotónico y un tratamiento con calor de alrededor de 90-100°C hasta que sucede la lisis celular y se produce la dispersión de componentes intracelulares (generalmente de 1 a 15 minutos). Después de la fase de calor, los reactivos para la amplificación pueden añadirse directamente al lisado celular. La secuencia de ácidos nucleicos inicial puede contener más de una secuencia de ácidos nucleicos específica deseada. El proceso de amplificación no es solo útil para producir grandes cantidades de una secuencia de ácidos nucleicos específica, sino que también permite la amplificación simultánea de más de una secuencia de ácidos nucleicos específica diferente, localizadas en la misma molécula de ácidos nucleicos o en moléculas diferentes.

Los cebadores desempeñan un papel crucial en el proceso de la PCR. El término "cebador" utilizado durante la descripción del proceso de amplificación puede referirse a más de un cebador, concretamente en el caso en el que exista cierta ambigüedad en la información referente a las secuencias terminales del fragmento a amplificar o cuando se utilice el proceso con cebadores degenerados descrito en la patente internacional WO 91/05753. Por ejemplo, en el caso en el que la secuencia de ácidos nucleicos se infiere de la información procedente de la secuencia proteica, para cada hebra puede utilizarse una colección de cebadores que contenga las secuencias que representan todas las posibles variaciones en los codones basadas en la degeneración del código genético. Un cebador de dicha colección deberá ser lo suficientemente homólogo a una porción de la secuencia deseada a amplificar como para ser útil en la amplificación.

Además, se puede amplificar más de una secuencia de ácidos nucleicos específica a partir de los ácidos nucleicos iniciales o de la mezcla de ácidos nucleicos, siempre que se utilice el número apropiado de oligonucleótidos cebadores diferentes. Por ejemplo, si se quieren obtener dos secuencias específicas de ácidos nucleicos diferentes, se utilizan

cuatro cebadores. Dos de los cebadores serán específicos para una de las secuencias específicas de ácidos nucleicos, y los otros dos serán específicos para la segunda secuencia específica de ácidos nucleicos. De esta manera, cada una de las dos secuencias específicas diferentes se pueden obtener exponencialmente mediante el presente proceso.

Para obtener una mayor especificidad en la reacción se puede amplificar una secuencia dentro de una secuencia dada tras un número determinado de ciclos de amplificación añadiendo, después de un ciclo de amplificación, una serie de cebadores que sean complementarios a secuencias internas (es decir, secuencias que no se encuentran en los extremos) de la secuencia que debe ser amplificada. Dichos cebadores pueden añadirse en cualquier etapa y proporcionarán la amplificación de un fragmento más corto. De forma alternativa, se puede preparar un fragmento más largo utilizando cebadores con extremos no complementarios pero que se solapan ligeramente con los cebadores utilizados previamente en la amplificación.

Los cebadores también desempeñan un papel crucial cuando el proceso de amplificación se utiliza para la mutagénesis *in vitro*. El producto de una reacción de amplificación en la que los cebadores utilizados no son exactamente complementarios al molde original contendrán la secuencia del cebador y no la del molde, de manera que se introduce una mutación *in vitro*. En ciclos posteriores, esta mutación será amplificada sin una disminución de la eficiencia porque ya no se necesitará que el cebador no sea exactamente complementario. El proceso de obtención de una secuencia de DNA alterada, tal y como se ha descrito anteriormente, se puede repetir en el DNA alterado utilizando otros cebadores para inducir cambios posteriores en la secuencia. De esa manera, se pueden obtener gradualmente una serie de secuencias mutadas en las que cada nueva adición a la serie difiere en muy poca medida de la última secuencia, pero es cada vez más distinta de la secuencia de DNA original que servía de fuente.

Dado que el cebador puede contener como parte de su secuencia una secuencia no complementaria, siempre y cuando una porción suficiente del cebador contenga una secuencia complementaria a la hebra a amplificar, se pueden descubrir muchas otras ventajas. Por ejemplo, se puede unir al extremo 5' de uno de los dos cebadores una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a la secuencia del molde (como, p. ej., un promotor, un ligador, una secuencia codificante, etc.) y queda añadida al producto del proceso de amplificación. Una vez que el cebador de extensión se ha añadido, se realizan los ciclos suficientes para conseguir la cantidad deseada del nuevo molde que contiene el inserto de nucleótidos no complementarios. Esto permite la producción de grandes cantidades de fragmentos combinados en un periodo de tiempo relativamente corto (p. ej., dos horas o menos) utilizando una única técnica.

Los oligonucleótidos cebadores se pueden preparar utilizando cualquier método apropiado, como, por ejemplo, los métodos fosfotriéster y fosfodiéster descritos anteriormente o las realizaciones automatizadas de los mismos. En una de esas realizaciones automatizadas, se utilizan dietilfosforamiditas como materia prima inicial y se pueden sintetizar tal y como se describe en Beaucage *et al.*, Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1862. En la patente estadounidense US 4 458 066 se describe un método para sintetizar oligonucleótidos en un soporte modificado. También se puede utilizar un cebador que ha sido aislado de una fuente biológica (como los productos digeridos por una endonucleasa de restricción).

Sin embargo, cualesquiera que sean los cebadores utilizados, la mezcla de reacción debe contener un molde para que la PCR se lleve a cabo, porque la secuencia de ácidos nucleicos específica se obtiene utilizando una molécula de ácidos nucleicos que contiene la secuencia como molde. El primer paso implica la puesta en contacto de cada hebra de ácidos nucleicos con cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y dos oligonucleótidos cebadores para cada secuencia específica de ácidos nucleicos que se quiera amplificar o detectar. Si los ácidos nucleicos que se van a amplificar o detectar son DNA, entonces los nucleósidos trifosfato que utilizan son generalmente dATP, dCTP, dGTP y dTTP, aunque también se pueden utilizar durante el proceso diversos derivados de nucleótidos. Por ejemplo, cuando se utiliza la PCR para detectar una secuencia conocida en una muestra con secuencias desconocidas, el dTTP suele sustituirse por dUTP para reducir la contaminación entre las muestras, tal y como se muestra en la patente internacional WO 91/05210.

La concentración de nucleósidos trifosfato pueden variar ampliamente. Típicamente, la concentración se sitúa entre 50 y 500 μM para cada dNTP en el tampón de amplificación, y el MgCl_2 se encuentra en el tampón en una concentración de entre 1 a 3 mM para activar la polimerasa e incrementar la especificidad de la reacción. Sin embargo, para algunas aplicaciones se prefieren unas concentraciones de dNTP de 1 a 20 pM, como la secuenciación de DNA o la generación de sondas marcadas radiactivamente con una actividad altamente específica.

Las hebras de ácidos nucleicos del ácido nucleico diana sirven como molde para la síntesis de hebras de ácidos nucleicos adicionales que son productos de extensión de los cebadores. Dicha síntesis se puede llevar a cabo utilizando cualquier método apropiado, pero generalmente se da en una solución acuosa tamponada, preferiblemente a pH entre 7 y 9, más preferiblemente alrededor de 8. Para facilitar la síntesis, se añade un exceso molar de los dos oligonucleótidos cebadores al tampón que contiene las hebras molde. Como una cuestión práctica, la cantidad de cebador añadido se encontrará con un exceso molar sobre la cantidad de hebra complementaria (molde) cuando la secuencia a amplificar se encuentre en una mezcla de hebras de ácidos nucleicos de cadena larga complejos. Se prefiere un gran exceso molar para mejorar la eficiencia del proceso. Por consiguiente, se utiliza generalmente una proporción cebador:molde de al menos 1000:1 o superior para moldes de DNA clonado y proporciones cebador:molde de alrededor de 100:1 o superior cuando se amplifican muestras genómicas complejas.

Entonces, la mezcla de molde, cebador y nucleósidos trifosfato se trata en función de si los ácidos nucleicos a amplificar o detectar son de cadena sencilla o de cadena doble. Si los ácidos nucleicos son de cadena sencilla, no es necesario realizar una fase de desnaturalización previa al primer ciclo de extensión y la mezcla de extensión se mantiene a una temperatura que favorezca la hibridación del cebador con su secuencia diana complementaria (molde).
 5 Generalmente, dicha temperatura se sitúa entre 35 y 65°C o más, preferiblemente alrededor de entre 37 y 60°C, y durante el tiempo necesario, generalmente desde unos pocos segundos hasta cinco minutos, preferiblemente entre 30 segundos y un minuto. Se puede utilizar una temperatura de hibridación de entre 35 y 70°C. Los cebadores con una longitud de 15 nucleótidos o más se utilizan para incrementar la especificidad de la hibridación del cebador. Los cebadores más cortos necesitan temperaturas de hibridación más bajas.

10 Se puede sintetizar el complementario al ácido nucleico de cadena sencilla original añadiendo un polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la invención con el tampón apropiado, dNTP y uno o más oligonucleótidos cebadores. Si se utiliza un cebador único adecuado, el producto de extensión será complementario a los ácidos nucleicos de cadena única e hibridarán con la hebra de ácidos nucleicos formando una doble cadena con hebras de igual o
 15 distinta longitud (dependiendo del lugar en el que el cebador hibride con el molde), que puede ser separado en hebras sencillas tal como se ha descrito anteriormente para producir dos hebras complementarias separadas. Entonces puede añadirse un segundo cebador de manera que los ciclos posteriores de extensión se produzcan utilizando como moldes tanto la hebra inicial de ácidos nucleicos como el producto de extensión del primer cebador. De forma alternativa, se pueden añadir dos o más cebadores adecuados (uno de los cuales debe servir como cebador para síntesis utilizando
 20 como molde el producto de extensión del otro cebador) al ácido nucleico de cadena única y llevarse a cabo la reacción.

Si los ácidos nucleicos contienen dos hebras, como es el caso de la amplificación de una diana de doble cadena o del segundo ciclo de amplificación de una diana de cadena única, las hebras de los ácidos nucleicos deben separarse antes de que los cebadores hibriden. Esta separación de hebras se puede llevar a cabo mediante cualquier método
 25 adecuado de desnaturalización, incluyendo métodos físicos, químicos y enzimáticos. Uno de los métodos físicos preferidos para separar las hebras de los ácidos nucleicos implica el calentamiento de los ácidos nucleicos hasta que se produce la desnaturalización completa (> 99%). Los procesos típicos de desnaturalización por calor implican unas temperaturas que oscilan entre alrededor de 80 y 105°C durante periodos de tiempo que varían desde unos pocos segundos hasta minutos, según la composición y el tamaño de los ácidos nucleicos. Preferentemente, la temperatura de
 30 desnaturalización efectiva se sitúa entre 90 y 100°C durante un tiempo comprendido entre unos segundos y un minuto. La separación de las hebras también se puede inducir con una enzima de la clase conocida como helicasas o la enzima RecA, que posee actividad helicasa y se sabe que en presencia de ATP desnaturaliza el DNA. En Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology 43 (1978) 63 se describen las condiciones de reacción apropiadas para separar las hebras de ácidos nucleicos con helicasas, y en Radding, C.M., Ann. Rev. Genetics 16 (1982) 405-437 se recogen
 35 las técnicas de utilización de RecA. La desnaturalización produce dos hebras complementarias separadas de igual o distinta longitud.

Si los ácidos nucleicos de doble cadena se desnaturalizan por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que favorezca la hibridación de cada cebador con la secuencia complementaria diana (molde). Generalmente, dicha temperatura se sitúa entre 35 y 65°C o más, dependiendo de los reactivos, preferiblemente alrededor de
 40 entre 37 y 60°C. La temperatura de hibridación se mantiene durante el tiempo necesario, generalmente desde unos pocos segundos hasta minutos, preferiblemente entre 10 segundos y un minuto. A efectos prácticos, la temperatura se reduce simplemente desde los 95°C hasta una temperatura tan baja como los 37°C y la hibridación se produce a una temperatura dentro de ese intervalo.

45 Tanto si los ácidos nucleicos son de doble cadena como de cadena sencilla, se puede añadir un polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la invención antes del paso de desnaturalización, durante el mismo o cuando la temperatura se reduce o se encuentra en el intervalo que favorece la hibridación. A pesar de que la termoestabilidad de las polimerasas de la invención permite añadir dichas polimerasas a la mezcla de reacción en cualquier momento,
 50 se puede inhibir sustancialmente la amplificación inespecífica añadiendo la polimerasa a la mezcla de reacción a partir del momento en el que la mezcla no vaya a enfriarse por debajo de la temperatura de hibridación astringente. Tras la hibridación, la mezcla de reacción se calienta o se mantiene a una temperatura en la que la actividad del polipéptido con actividad DNA polimerasa se ve favorecida u optimizada, es decir, a una temperatura suficiente como para incrementar la actividad del polipéptido con actividad DNA polimerasa al llevar a cabo la síntesis de productos
 55 de extensión de cebadores a partir de la hibridación entre el cebador y el molde. De hecho, la temperatura debe ser apropiada para permitir la síntesis de un producto de extensión de cada cebador que sea complementario a los ácidos nucleicos molde, pero no debe ser tan elevada como para desnaturalizar cada producto de extensión de su molde complementario (es decir, la temperatura se encuentra generalmente por debajo de entre 80 y 90°C).

60 Según los ácidos nucleicos utilizados, la temperatura efectiva típica para la reacción de síntesis generalmente oscila entre alrededor de 40 a 80°C, preferiblemente entre 50 y 75°C. Más preferiblemente, la temperatura oscila entre alrededor de 65 a 75°C para el polipéptido con actividad DNA polimerasa de la presente invención. El periodo de tiempo necesario para la síntesis puede oscilar desde alrededor de 10 segundos hasta varios minutos o más, dependiendo fundamentalmente de la temperatura, la longitud de los ácidos nucleicos, la enzima y la complejidad de la mezcla de
 65 ácidos nucleicos. Generalmente, el tiempo de extensión es de aproximadamente 30 segundos a varios minutos. Si los ácidos nucleicos tienen una mayor longitud, generalmente se necesita un periodo de tiempo más largo para la síntesis de las hebras complementarias.

La nueva hebra sintetizada y la hebra de ácidos nucleicos complementaria forman una molécula de doble cadena que se utiliza en los pasos posteriores del proceso de amplificación. En el siguiente paso, las hebras de la molécula de doble cadena se separan mediante desnaturalización por calor a una temperatura efectiva y durante el tiempo necesario para desnaturalizar la molécula, pero no a una temperatura ni durante un periodo de tiempo que provoquen que el polipéptido con actividad DNA polimerasa se desnaturalice o inactive de forma completa e irreversible. Tras el proceso de desnaturalización del molde, se baja la temperatura hasta un nivel que favorezca la hibridación del cebador con la molécula complementaria de cadena sencilla (molde) producida en el paso previo, tal como se ha descrito anteriormente.

Al mismo tiempo o después de esta fase de hibridación, la temperatura se ajusta a una temperatura efectiva que favorezca la actividad del polipéptido con actividad DNA polimerasa para sintetizar productos de extensión de cebadores utilizando como molde las hebras nuevas sintetizadas y las originales. Nuevamente, la temperatura no debe ser tan elevada como para separar (desnaturalizar) el producto de extensión de su molde, tal como se ha descrito anteriormente. La hibridación puede tener lugar durante esta fase, de manera que la fase previa de enfriamiento después de la desnaturalización no sea necesaria. En ese caso, utilizando pasos simultáneos, el intervalo de temperaturas preferido es de 50 a 70°C.

Los pasos de calentamiento y enfriamiento implicados en un ciclo de separación de hebras, hibridación y síntesis del producto de extensión se pueden repetir tantas veces como sea necesario para producir la cantidad deseada de la secuencia específica de ácidos nucleicos. La única limitación son las cantidades presentes de los cebadores, los polipéptidos con actividad DNA polimerasa y los nucleósidos trifosfato. Generalmente, se realizan entre 15 y 30 ciclos. Para la detección diagnóstica de un DNA amplificado, el número de ciclos dependerá de la naturaleza de la muestra, la concentración inicial de la diana en la muestra y la sensibilidad del proceso de detección utilizado después de la amplificación. Para obtener una sensibilidad de detección determinada, será necesario un número menor de ciclos si la muestra a amplificar es pura y la concentración inicial de la diana es elevada. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos y la concentración inicial de la diana es baja, se necesitarán más ciclos para amplificar suficientemente la señal para su detección. Para una amplificación y detección generales, el proceso suele repetirse alrededor de 15 veces. Cuando la amplificación se utiliza para generar secuencias que se detecten con sondas marcadas específicas de secuencia, y cuando el DNA genómico humano es la diana de la amplificación, el proceso se repite entre 15 y 30 veces para amplificar la secuencia de forma suficiente para producir una señal claramente detectable; es decir, de manera que el ruido de fondo no interfiera con la detección.

No es necesario añadir nucleótidos, cebadores o polipéptidos con actividad DNA polimerasa adicionales después de la adición inicial, siempre que ningún reactivo crucial se haya agotado y que el polipéptido con actividad DNA polimerasa no se haya desnaturalizado o inactivado irreversiblemente, en cuyo caso debería añadirse polimerasa adicional u otro reactivo para que la reacción continúe. Una vez que se ha completado el número de ciclos apropiado para producir la cantidad deseada de la secuencia de ácidos nucleicos específica, la reacción puede pararse de la forma habitual, es decir, desactivando el polipéptido con actividad DNA polimerasa añadiendo EDTA, fenol, SDS o CHCl_3 , o separando los componentes de la reacción.

El proceso de amplificación puede llevarse a cabo de forma continua. En una realización de un proceso automatizado, la mezcla de reacción puede ser sometida a ciclos de temperatura de manera que se programe el control de la temperatura hasta un nivel y durante un periodo de tiempo determinados. Uno de dichos instrumentos utilizados con ese propósito es un aparato automatizado para llevar a cabo la reacción de amplificación desarrollado y comercializado por Perkin-Elmer Cetus Instruments. Con la compra del instrumento se suministran las instrucciones detalladas para llevar a cabo una PCR con dicho instrumento. Otro ejemplo de ese tipo de aparatos es el LightCycler disponible en Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania.

El polipéptido con actividad DNA polimerasa de la presente invención es muy útil en los diversos procesos en los que la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos mediante PCR resulta útil. El método de amplificación puede ser utilizado para clonar una secuencia de ácidos nucleicos en particular para su inserción en un vector de expresión adecuado, tal como se describe en la patente estadounidense US 4 800 159. El vector se puede utilizar para transformar una célula huésped apropiada que sirva para producir el producto génico de la secuencia mediante métodos estándar de la tecnología del DNA recombinante. Dicha clonación puede implicar la ligación directa en un vector utilizando la ligación de extremos romos o la utilización de enzimas de restricción que escindan en sitios incluidos dentro de los cebadores. Otros procesos apropiados para las DNA polimerasas termoestables de la presente invención incluyen los descritos en las patentes estadounidenses US 4 683 195 y US 4 683 202 y las patentes europeas EP 0 229 701, EP 0 237 362 y EP 0 258 017. Además, la presente enzima es útil en la PCR asimétrica (véase, Gyllensten, U.B. y Erlich, H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 [1988] 7652-7656); PCR inversa (Ochman, H., *et al.*, *Genetics* 120 [1988] 621-623); y en la secuenciación de DNA (véanse Innis, M.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 [1988] 9436-9440 y McConlogue, L., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16 [1988] 9869), la amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE, en sus siglas en inglés), PCR con cebado aleatorio utilizada para amplificar una serie de fragmentos de DNA, y procesos de PCR con especificidad en un solo flanco de la secuencia como en la PCR anclada y la ligación mediada por PCR anclada tal como se describen en Loh, E., en *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* (1991) 2, pp. 11-19.

En concreto, el polipéptido con actividad DNA polimerasa de acuerdo con la invención es útil para amplificar un ácido nucleico diana utilizando el LightCycler. El instrumento LightCycler, así como los protocolos para llevar a

cabo la PCR, se describen en el manual “LightCycler Operator’s Manual Version 3.5” (octubre de 2000) disponibles en Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania. Por consiguiente, las recomendaciones ofrecidas en el apartado 4.3.1 también son aplicables a Taq Δ 288. Otra realización de la invención consiste en un método para la secuenciación de ácidos nucleicos que consta de una fase de generación de fragmentos con cadena terminada a partir del molde de ácidos nucleicos que va a ser secuenciado con un polipéptido de acuerdo con la invención, en presencia de al menos un agente terminador de cadena y uno o más nucleótidos trifosfato, y la determinación de la secuencia de dichos ácidos nucleicos a partir de los tamaños de dichos fragmentos.

En los últimos años, el método de secuenciación de DNA de Sanger basado en los didesoxinucleótidos (Sanger, F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 [1977] 5463-5467) ha sido sometido a un refinamiento significativo, incluyendo el desarrollo de nuevos vectores (Yanisch-Perron, C., *et al.*, Gene 33 [1985] 103-119), análogos de bases (Mills, D.R. y Kramer, F.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 [1979] 2232-2235 y Barr *et al.*, BioTechniques 4 [1986] 428-432), enzimas (Tabor, S. y Richardson, C.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 [1987] 4767-4771 e Innis, M.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 [1988] 9436-9440) e instrumentos para realizar un análisis de secuencias de DNA parcialmente automatizado (Smith, L.M. *et al.*, Nature 321 [1986] 674-679; Prober, J.M. *et al.*, Science 238 [1987] 336-341 y Ansorge, W. *et al.*, Nuc. Acids Res. 15 [1987] 4593-4602). El procedimiento básico de secuenciación didesoxi implica (i) la hibridación de un oligonucleótido cebador a un molde de DNA apropiado de cadena sencilla o de cadena doble desnaturizado; (ii) la extensión del cebador con una DNA polimerasa en cuatro reacciones separadas, cada una de las cuales contiene un dNTP o ddNTP α -marcado (de forma alternativa se puede utilizar un cebador marcado), una mezcla de dNTP no marcados y un didesoxinucleótido-5'-trifosfato (ddNTP) terminador de cadena; (iii) la separación de los cuatro grupos de productos de reacción en un gel de poliacrilamida-urea de elevada resolución; y (iv) la producción de una imagen autorradiográfica del gel que pueda examinarse para inferir la secuencia de DNA. Alternativamente, se pueden utilizar los cebadores o los nucleótidos marcados con fluorescencia para identificar los productos de la reacción. Métodos conocidos de secuenciación didesoxi utilizan DNA polimerasas como el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, la transcriptasa inversa, la DNA polimerasa Taq o una DNA polimerasa T7 modificada.

Como una alternativa a la secuenciación por el método didesoxi básico, la secuenciación didesoxi cíclica consiste en una amplificación asimétrica y lineal de las secuencias diana en presencia de terminadores de cadena didesoxi. Un ciclo produce una familia de productos de extensión de todas las longitudes posibles. Tras la desnaturización del producto de la reacción de extensión obtenido a partir del molde de DNA, se producen múltiples ciclos de hibridación y extensión de cebadores en presencia de terminadores didesoxi. El proceso es diferente al de la PCR en el que solo se utiliza un cebador, el crecimiento de los productos de la reacción de secuenciación es lineal y los productos de amplificación presentan heterogeneidad en la longitud y no sirven como moldes para la siguiente reacción. La secuenciación didesoxi cíclica es una técnica que proporciona ventajas a los laboratorios que utilizan instrumentos de secuenciación de DNA automatizada y para otros laboratorios que tienen un gran volumen de secuenciación. Es posible secuenciar el DNA genómico directamente, sin clonación, gracias a la especificidad de la técnica y al incremento en la cantidad de señal generada. Los protocolos de secuenciación cíclica permiten la utilización de moldes de cadena sencilla y de cadena doble, incluyendo moldes genómicos, clonados y amplificados por PCR.

Las DNA polimerasas con una mayor termoestabilidad, en concreto Taq Δ 288, presentan diversas ventajas en los procesos de secuenciación cíclica: toleran las temperaturas de hibridación astringentes que son necesarias para la hibridación específica del cebador con las dianas genómicas, así como toleran los múltiples ciclos de desnaturización a elevada temperatura que tienen lugar en cada ciclo. Al llevar a cabo la reacción de extensión a elevadas temperaturas, es decir, a 70-75°C, se obtiene como resultado una mejora significativa de los resultados de la secuenciación con DNA que contiene estructuras secundarias, debido a la desestabilización de la estructura secundaria. Sin embargo, dichas temperaturas no eliminarán todas las estructuras secundarias.

Se presentan los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias, tablas y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención cuyo auténtico ámbito de aplicación se expone en las reivindicaciones anexas. Cabe resaltar que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin alejarse del espíritu de la invención.

Listado de referencias

- Ansorge, W. *et al.*, Nuc. Acids Res. 15 (1987) 4593-4602.
- Barr *et al.*, BioTechniques 4 (1986) 428-432.
- Beaucage *et al.*, Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1862.
- Bessman *et al.*, J. Biol. Chem. 223 (1957) 171-177.
- Buttin, G. y Kornberg, A., J. Biol. Chem. 241 (1966) 5419-5427.
- Chien *et al.*, Chemical Abstract 85, No. 155559t (1976).
- Chou, Q. *et al.*, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 1717-1723.

ES 2 278 249 T3

Cohen, S.N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2110-2114.

EP 0 229 701

5 EP 0 237 362

EP 0 258 017

EP 0 771 870

10 EP 1 069 131

Graham y van der **Eb**, *Virology* 52 (1978) 546.

15 **Gyllensten**, U.B. y **Erllich**, H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7652-7656.

Hsiao, C.L. y **Carbon**, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3829-3833.

Innis, M.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 9436-9440.

20 **Kaledin** *et al.*, *Chemical Abstract* 93, Núm. 40169p (1989).

Kuhn Hoffmann-Berling, *CSH-Quantitative Biology* 43 (1978) 63.

25 **Lawyer**, F.C. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 6427-6437.

Loh, E. en *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* (1991) 2, pp. 11-19.

Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982, pp. 280-281

McConlogue, L. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 9869.

35 McCutcheon's Emulsifiers & Detergents, edición norteamericana (1983), McCutcheon Division of MC Publishing Co., 175 Rock Road, Glen Rock, NJ (USA), pp. 295-298.

Mills, D.R. y **Kramer**, F.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2232-2235.

Ochman, H. *et al.*, *Genetics* 120 (1988) 621-623.

40 **Prober**, J.M. *et al.*, *Science* 238 (1987) 336-341.

Qiagen manual "The QIAexpressionist™", 5ª edición, junio de 2003.

45 **Radding**, C.M., *Ann. Rev. Genetics* 16 (1982) 405-437.

Saiki, R.K. *et al.*, *Science* 230 (1985) 1350-1354.

Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición, CSHL Press, 2001.

50 **Sanger**, F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467.

Sharkey, D.J. *et al.*, *BioTechnology* 12 (1994) 506-509.

55 **Shaw**, C.H. *et al.*, *Gene* 23 (1983) 315-330.

Smith, L.M. *et al.*, *Nature* 321 (1986) 674-679.

Tabor, S. y **Richardson**, C.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 4767-4771.

60 US 4 458 066

US 4 683 195

65 US 4 683 202

US 4 889 818

US 4 965 188

US 5 079 352

5 US 5 338 671

US 5 436 149

10 US 5 616 494

US 5 773 258

US 5 854 018

15 US 5 856 123

US 5 885 813

20 US 5 919 651

US 6 183 998

US 6 479 264

25 van Solingen, P. y Plaat, J.B., *J. Bact.* 130 (1977) 946-947.

WO 91/02090

WO 91/05210

30 WO 91/05753

Yanisch-Perron, C. *et al.*, *Gene* 33 (1985) 103-119.

35 Descripción de las figuras

Figura 1. Comparación de cuatro experimentos para determinar las actividades relativas de TaqΔ288 (1), TaqΔ279 (2), TaqΔ289 (3) y TaqWT (4). Las barras que corresponden al mismo experimento se indican mediante el mismo patrón de relleno. Las barras representan los valores numéricos mostrados en la Tabla 1.

40 Ejemplo 1

Construcción y producción de un mutante por delección de TaqΔ288 A partir de la secuencia de DNA que codifica TaqWT con ID. de SEC. núm.: 6, un oligonucleótido cebador que incluye la secuencia de DNA que codifica la secuencia MRGS-6xHis-IEGR y un oligonucleótido cebador que hibrida con la secuencia de DNA del extremo C-terminal de TaqWT se genera mediante PCR un DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de ID. de SEC. núm.:5. El constructo se inserta en el vector de expresión pQE80L.

50 Ejemplo 2

Actividad de la polimerasa Taq WT y de variantes de delección del extremo N-terminal de la Taq polimerasa en lisados bacterianos

Mediante el vector de expresión pQE80L (Núm. de catálogo Qiagen 32923) se clonaron los marcos de lectura de TaqWT, TaqΔ279, TaqΔ288 y TaqΔ289 en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue según procedimientos estándar (Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001; Qiagen manual "The QIAexpressionTM", 5ª edición, junio 2003). Las colonias transformadas se inoculan en medio dYT (por 1 H₂O 16 g de Bacto Trypton, 10 g de Bacto Yeast Extract, 5 g de NaCl, ampicilina 25 μM) y se dejan crecer durante toda la noche en microplacas (Falcon núm. 353227) a 37°C en agitación (agitador, 150 revoluciones por minuto). Se mezclan 100 μl del cultivo anterior con 100 μl de medio fresco y se incuba durante 1 hora. Se añade IPTG hasta una concentración final de 500 μM y se incuba durante 4 h más. Posteriormente, se lisan las bacterias mezclando el cultivo con una solución B-PER[®] al 10% (B-PER Protein Extraction Reagents, Pierce) e incubando la mezcla a 60°C durante 20 min. Las microplacas se centrifugan a 3300 revoluciones por minuto (rpm) para precipitar los restos del lisado. Se pipetea una primera alícuota de 40 μl de cada lisado en una placa Eppendorf PCR (96 cavidades con un volumen de 0,2 ml cada una). La placa se incuba durante 35 min a 97°C en un termociclador Eppendorf "Mastercycler gradient". Una segunda alícuota de 40 μl de cada lisado se mantiene a temperatura ambiente como control positivo.

ES 2 278 249 T3

Posteriormente, se transfieren a otra microplaca (Costar núm. 3903, 96 pocillos) 30-40 μ l de cada lisado (los sometidos a calor y los controles) y se mezclan con una mezcla maestra de PCR hasta alcanzar un volumen final de 100 μ l. La mezcla maestra de PCR contiene 10 μ l de tampón Taq 10x; dATP, dCTP y dGTP a 0,15 mM cada uno; dNTP 0,2 mM que contiene adicionalmente dUTP marcado con LightCycler Red - N-hidroxisuccinimida éster (equimolar);
 5 MgCl₂ 0,5 mM (además del MgCl₂ contenido en el tampón Taq 10x), y 50 pM de un molde marcado con fluoresceína según el ID. de SEC. núm.:8 (es decir, 0,5 μ l de una solución que contiene 1,6 μ g/ μ l) del molde). La microplaca se incubaba a 72°C durante 60 min para permitir la elongación del molde.

Posteriormente, las placas se enfrían a 40°C durante 10 min. La FRET (fluorescencia por transferencia resonante de energía) se cuantifica utilizando un fluorímetro (Tecan). La longitud de onda de excitación es de 485 nm. Las medidas de emisión de luz se realizan a una longitud de onda de 635 nm. Una vez eliminado el ruido de fondo, los valores de emisión son una función de la actividad DNA polimerasa residual. Para cada experimento se calcula un valor de actividad relativa dividiendo el valor obtenido para la muestra sometida a calor entre el valor obtenido con el control sin calentar y multiplicando el resultado por 100. La Tabla 1 resume los valores de actividad relativa de cuatro
 15 experimentos.

TABLA 1

Actividad relativa de los polipéptidos con actividad DNA polimerasa tras 35 min a 97 °C				
Núm. de experimento	Taq Δ 288	Taq Δ 279	Taq Δ 289	Taq Δ WT
1	67	31	18	-3
2	90	36	32	-1
3	62	46	24	-3
4	78	38	28	1

Ejemplo 3

Expresión y purificación de polipéptidos con actividad DNA polimerasa

Un volumen total de 4 l de medio dYT, se dividen en alícuotas de 800 ml en 21 frascos y se inoculan con la cepa de *E. coli* XL-1 Blue transformada con el vector de expresión pQE80L (Núm. de catálogo Qiagen 32923) en el que se han insertado los marcos de lectura de Taq Δ 288, Taq Δ 279 (Klentaq), el fragmento Stoffel (Taq Δ 290) y TaqWT. Las células se dejan crecer en un agitador de cultivos a 37°C (incubador agitador, 250 revoluciones por minuto). Cuando alcanzan una densidad óptica de alrededor de 0,8 (medido a 600 nm), se añade IPTG (isopropiltiogalactósido) hasta una concentración final de 500 μ M. Las células se dejan crecer hasta que alcanzan una densidad óptica entre 2 y 3. Entonces, se sedimentan mediante centrifugación y el sedimento se resuspende en tampón B50 (TrisHCl 25 mM pH 8,5, EDTA 0,1 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM [ditiotreitól], NaCl 50 mM) a temperatura ambiente.

Protocolo de purificación 1

Las células se lisan utilizando una prensa francesa dos veces a 1000 bar. Se añade NaCl a 1,5 M para separar las polimerasas del DNA. A continuación, la mezcla se calienta a 75°C durante 15 min en un baño de agua. Posteriormente, se deja la mezcla en el baño de agua sin calentarlo más durante otros 15 min. El precipitado se separa del sobrenadante mediante centrifugación. El sobrenadante se dializa frente a tampón B100 (TrisHCl 25 mM pH 8,5, EDTA 0,1 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM [ditiotreitól], NaCl 100 mM). A continuación se llevan a cabo los pasos cromatográficos. En primer lugar, se utiliza una columna de sefarosa-heparina y la elución del polipéptido Taq Δ 288 se realiza mediante un gradiente de elución con B100 y B600 (TrisHCl 25 mM pH 8,5, EDTA 0,1 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM [ditiotreitól], NaCl 600 mM). Tras la diálisis de la fracción que contiene Taq Δ 288 frente a B50, la enzima se purifica posteriormente con una columna de sefarosa Q y mediante la elución con un gradiente entre B50 y B250 (TrisHCl 25 mM pH 8,5, EDTA 0,1 mM, glicerol al 5%, DTT 1 mM [ditiotreitól], NaCl 250 mM). Finalmente, la fracción donde está eluida Taq Δ 288 se dializa frente al tampón de almacenamiento (glicerol al 50% [v/v], KCl 100 mM, TrisHCl 20 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Thesit al 0,25%).

Protocolo de purificación 2

La utilización de colas de histidina durante la purificación facilita este proceso. Se resuspenden 5 g de las células sedimentadas en 25 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, PMSF [fluoruro de fenilmetilsulfonilo] 0,1 mM, DTT 1 mM, pH 8,0) y se lisan mediante ultrasonidos. Se añaden desoxirribonucleasa I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) hasta una concentración final de 20 mg/ml y MgCl₂ hasta una concentración final de 4 mM. La mezcla se incuba a 25°C durante 30 min y tras esa incubación, se incuba durante 30 min más a 72°C. El precipitado se sedimenta por centrifugación (22 000 x g). El sobrenadante limpio se carga en una columna Ni-NTA *Superflow* (Qiagen). La columna se lava con dos volúmenes de tampón A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0). La columna se eluye con 100 ml de tampón A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0) en un gradiente lineal que empieza en el tampón A y finaliza con el tampón B (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). El polipéptido TaqΔ288 con cola de histidinas se purifica posteriormente por cromatografía de intercambio aniónico con sefarosa Q. Finalmente, la fracción que contiene el polipéptido TaqΔ288 se dializa frente al tampón de almacenamiento.

Con el objetivo de eliminar la cola de histidinas, el polipéptido TaqΔ288 con cola de histidinas purificado mediante Ni-NTA se dializa frente al tampón de reacción Xa (TrisHCl 20 mM pH 6,5, NaCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM). La proteasa factor Xa (1 U por mg de polipéptido TaqΔ288) se añade a una proporción 1:10 respecto al volumen de reacción total del tampón de reacción concentrado 10x. La mezcla se incuba entre 3 y 6 días a 4°C y posteriormente se sube el pH hasta 8,0 añadiendo TrisHCl 1 M pH 8,5 (alrededor de 1/100 del volumen). Posteriormente, se añade el Ni-NTA *Superflow* equilibrado y la mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (rotación). Los sobrenadantes se separan del material de la Ni-NTA *Superflow* con polipéptidos TaqΔ288 con cola de histidinas y se inactivan por calor a 72°C durante 30 min. Los siguientes pasos consisten en la cromatografía de intercambio aniónico con sefarosa Q seguida de diálisis frente al tampón de almacenamiento.

*Ejemplo 4**Actividad de TaqΔ288*

La actividad DNA polimerasa se determina mediante procedimientos estándar mediante la hibridación, en primer lugar, de un cebador M13 con DNA M13mp9ss a 65°C e incorporando, entonces, α³²dCTP marcado radiactivamente. La incorporación se mide mediante el recuento en líquido de centelleo. La actividad se compara con un lote maestro de TaqWT que sirve como referencia. En la Tabla 2 se resumen los resultados.

TABLA 2

Actividades específicas de los polipéptidos con actividad DNA polimerasa	
TaqWT	~100 kU/mg
TaqΔ288	~77 kU/mg
TaqΔ279	~370 kU/mg
TaqΔ290	~111 kU/mg

En referencia a la presencia o ausencia de colas de histidina en el polipéptido TaqΔ288, no se han detectado diferencias respecto a su actividad DNA polimerasa.

*Ejemplo 5**Caracterización molecular de TaqΔ288*

Se preparó polipéptido TaqΔ288 sin cola de histidinas. La secuenciación N-terminal ha revelado la siguiente secuencia de aminoácidos: ESPKALEEAPWPPPE. El peso molecular del polipéptido TaqΔ288 se ha valorado en 62,5 kDa mediante la técnica MALDITOF.

*Ejemplo 6**Citraconación de TaqΔ288*

Se hacen reaccionar 3 mg de polipéptido TaqΔ288 con cola de histidinas purificado en 3 ml de tampón de reacción (HEPES 50 mM, KCl 300 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5) con 2 μl de anhídrido citracónico durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la fracción donde está eluida TaqΔ288 se dializa frente al tampón de almacenamiento (glicerol al 63% [p/v], KCl 100 mM, TrisHCl 20 mM pH 8,5, EDTA 0,1 mM, Tween 20 al 0,5%, DTT 1 mM).

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido con actividad DNA polimerasa **caracterizado** por presentar la secuencia de aminoácidos de ID. de SEC. núm.:2.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 **caracterizado** porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido presenta un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal.
3. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
4. La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** por presentar la secuencia de nucleótidos con ID. de SEC. núm.:1 y 3.
5. Un vector de DNA recombinante que consta de una secuencia de DNA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4.
6. El vector de DNA recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 **caracterizado** porque la secuencia de DNA codifica un polipéptido de fusión que consta de:
 - (i) una cola de histidinas terminal,
 - (ii) una secuencia de aminoácidos que proporciona un sitio de escisión para la proteasa factor X adyacente a la cola de histidinas, y
 - (iii) el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1
7. El vector de DNA recombinante de acuerdo con la reivindicación 6 **caracterizado** porque la secuencia de DNA codifica un polipéptido de fusión que posee la secuencia de aminoácidos de ID. de SEC. núm.:5.
8. Un método para obtener un polipéptido con actividad DNA polimerasa que consta de los siguientes pasos:
 - (a) la transformación de una célula huésped con un vector de DNA recombinante de acuerdo con la reivindicación 5,
 - (b) el cultivo de las células huésped y la expresión del polipéptido con actividad DNA polimerasa en dichas células huésped,
 - (c) la purificación del polipéptido con actividad DNA polimerasa expresado en el paso (b).
9. Un método para obtener un polipéptido con actividad DNA polimerasa que consta de los siguientes pasos:
 - (a) la transformación de una célula huésped con un vector de DNA recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7,
 - (b) el cultivo de las células huésped y la expresión de un polipéptido de fusión en dichas células huésped que consta de,
 - (i) una cola de histidinas terminal,
 - (ii) una secuencia de aminoácidos que proporciona un sitio de escisión para la proteasa factor X adyacente a la cola de histidinas, y
 - (iii) el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1,
 - (c) la purificación del polipéptido de fusión expresado en el paso (b).
 - (d) la escisión del polipéptido de fusión mediante su incubación con una proteasa con la actividad proteolítica del factor X, de manera que separa el polipéptido con actividad DNA polimerasa del sitio de escisión de la proteasa del factor X y de la cola de histidinas,
 - (e) la purificación del polipéptido con actividad DNA polimerasa del paso (d).
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 **caracterizado** porque en el paso (c) se purifica la proteína de fusión utilizando una matriz de afinidad particulada capaz de unirse a la cola de histidinas.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 **caracterizado** porque en el paso (d) la cola de histidinas del polipéptido de fusión se encuentra unida a la matriz de afinidad particulada.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, **caracterizado** porque la matriz de afinidad particulada es un material de cromatografía cubierto de una resina quelante de metales y porque los iones metálicos se encuentren retenidos en el material de cromatografía recubierto.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12 **caracterizado** porque el material de cromatografía está recubierto con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA).

14. Una célula huésped transformada con un vector de DNA recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7.

15. Una preparación estabilizada que consta de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 en un tampón que contiene un detergente polimérico no iónico o más de uno.

16. Una preparación estabilizada de acuerdo con la reivindicación 15 en la que el polipéptido se une covalentemente a un compuesto capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une covalentemente a dicho polipéptido.

17. Una preparación estabilizada de acuerdo con la reivindicación 16 **caracterizado** porque el compuesto se selecciona del grupo formado por:

(a) anhídrido citracónico,

(b) anhídrido cis-aconítico,

(c) anhídrido 2,3-dimetilmaleico,

(d) anhídrido exo-cis-3,6-endo-delta 4-tetrahidroftálico,

(e) anhídrido 3,4,5,6-tetrahidroftálico.

18. Una preparación estabilizada de acuerdo con la reivindicación 15 en la que el polipéptido se une a un anticuerpo capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une a dicho polipéptido.

19. La utilización de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 unido covalentemente a un compuesto capaz de bloquear reversiblemente la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une covalentemente a él, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 unido a un anticuerpo capaz de bloquear reversiblemente la actividad DNA polimerasa del polipéptido cuando se une a él, o una preparación estabilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 15 a la 18, para producir productos de extensión de cebadores.

20. La utilización de acuerdo con la reivindicación 19 para secuenciar un molde de ácidos nucleicos.

21. La utilización de acuerdo con la reivindicación 19 para amplificar un ácido nucleico diana.

22. Un equipo para obtener productos de extensión de cebadores que consta de una preparación estabilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 15 a la 18.

23. Un método para amplificar un ácido nucleico diana en una muestra que consta de los siguientes pasos:

(a) poner en contacto dicha muestra con una mezcla de reacción de amplificación que contiene un cebador sustancialmente complementario a dicho ácido nucleico diana y un polipéptido seleccionado del grupo formado por:

(i) un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2,

(ii) un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, unido covalentemente a un compuesto capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido, y

(iii) un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, unido a un anticuerpo capaz de bloquear de forma reversible la actividad DNA polimerasa del polipéptido,

(b) opcionalmente, la liberación de la actividad DNA polimerasa mediante tratamiento por calor,

(c) la hibridación de la mezcla resultante del cebador mencionado en el paso (a) con los ácidos nucleicos diana,

ES 2 278 249 T3

(d) la amplificación de los ácidos nucleicos diana mediante la incubación de la mezcla después del paso (b) para permitir la formación de productos de extensión de cebadores.

24. Un método para la secuenciación de ácidos nucleicos que consta de una fase de generación de fragmentos con cadena terminada a partir del molde de ácidos nucleicos que va a ser secuenciado con un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en presencia de al menos un agente terminador de cadena y uno o más nucleótidos trifosfato, y la determinación de la secuencia de dichos ácidos nucleicos a partir de los tamaños de dichos fragmentos.

10

15

20

25

30

35

40

45

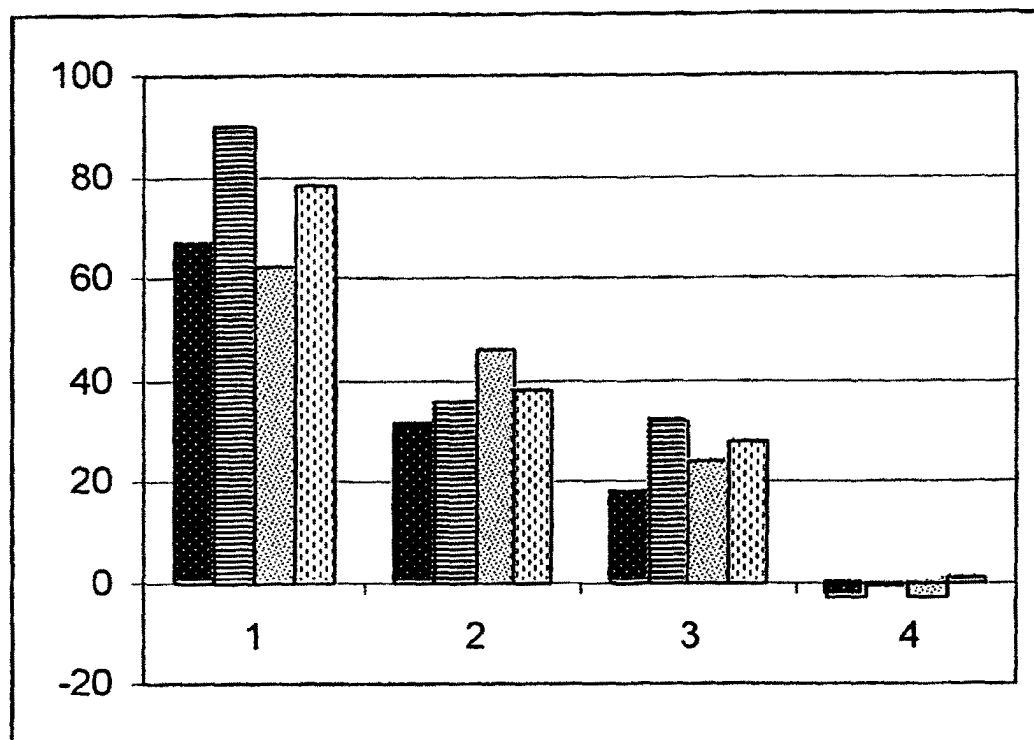
50

55

60

65

Figura 1



ES 2 278 249 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
5 <120> Fragmentos termoestables de la Taq polimerasa
<130> 21822
<160> 8
10 <170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 1638
<212> DNA
15 <213> Artificial
<220>
<223> taqD288_D-2, Faktor Xa-cortado
20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1638)
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1638)
30 <223> TaqDelta 288 sin metionina N-terminal

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 278 249 T3

<400> 1

5	gaa agc ccc aag gcc ctg gag gag gcc ccc tgg ccc ccg ccg gaa ggg Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly 1 5 10 15	48
10	gcc ttc gtg ggc ttt gtg ctt tcc cgc aag gag ccc atg tgg gcc gat Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp 20 25 30	96
15	ctt ctg gcc ctg gcc gcc gcc agg ggg ggc cgg gtc cac cgg gcc ccc Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro 35 40 45	144
20	gag cct tat aaa gcc ctc agg gac ctg aag gag gcg cgg ggg ctt ctc Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu 50 55 60	192
25	gcc aaa gac ctg agc gtt ctg gcc ctg agg gaa ggc ctt ggc ctc ccg Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro 65 70 75 80	240
30	ccc ggc gac gac ccc atg ctc ctc gcc tac ctc ctg gac cct tcc aac Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn 85 90 95	288
35	acc acc ccc gag ggg gtg gcc cgg cgc tac ggc ggg gag tgg acg gag Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu 100 105 110	336
40	gag gcg ggg gag cgg gcc gcc ctt tcc gag agg ctc ttc gcc aac ctg Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu 115 120 125	384
45	tgg ggg agg ctt gag ggg gag gag agg ctc ctt tgg ctt tac cgg gag Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu 130 135 140	432
50	gtg gag agg ccc ctt tcc gct gtc ctg gcc cac atg gag gcc acg ggg Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly 145 150 155 160	480
55	gtg cgc ctg gac gtg gcc tat ctc agg gcc ttg tcc ctg gag gtg gcc Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala 165 170 175	528
60	gag gag atc gcc cgc ctc gag gcc gag gtc ttc cgc ctg gcc ggc cac Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His 180 185 190	576

ES 2 278 249 T3

	ccc ttc aac ctc aac tcc cgg gac cag ctg gaa agg gtc ctc ttt gac	624
	Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp	
	195 200 205	
5	gag cta ggg ctt ccc gcc atc ggc aag acg gag aag acc ggc aag cgc	672
	Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg	
	210 215 220	
10	tcc acc agc gcc gcc gtc ctg gag gcc ctc cgc gag gcc cac ccc atc	720
	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile	
	225 230 235 240	
15	gtg gag aag atc ctg cag tac cgg gag ctc acc aag ctg aag agc acc	768
	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr	
	245 250 255	
20	tac att gac ccc ttg ccg gac ctc atc cac ccc agg acg ggc cgc ctc	816
	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu	
	260 265 270	
25	cac acc cgc ttc aac cag acg gcc acg gcc acg ggc agg cta agt agc	864
	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser	
	275 280 285	
30	tcc gat ccc aac ctc cag aac atc ccc gtc cgc acc ccg ctt ggg cag	912
	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln	
	290 295 300	
35	agg atc cgc cgg gcc ttc atc gcc gag gag ggg tgg cta ttg gtg gcc	960
	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala	
	305 310 315 320	
40	ctg gac tat agc cag ata gag ctc agg gtg ctg gcc cac ctc tcc ggc	1008
	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly	
	325 330 335	
45	gac gag aac ctg atc cgg gtc ttc cag gag ggg cgg gac atc cac acg	1056
	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr	
	340 345 350	
50	gag acc gcc agc tgg atg ttc ggc gtc ccc cgg gag gcc gtg gac ccc	1104
	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro	
	355 360 365	
55	ctg atg cgc cgg gcg gcc aag acc atc aac ttc ggg gtc ctc tac ggc	1152
	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly	
	370 375 380	
60	atg tgg gcc cac cgc ctc tcc cag gag cta gcc atc cct tac gag gag	1200
	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu	
	385 390 395 400	
65	gcc cag gcc ttc att gag cgc tac ttt cag agc ttc ccc aag gtg cgg	1248
	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg	
	405 410 415	

ES 2 278 249 T3

gcc tgg att gag aag acc ctg gag gag ggc agg agg cgg ggg tac gtg 1296
 Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
 420 425 430
 gag acc ctc ttc ggc cgc cgc cgc tac gtg cca gac cta gag gcc cgg 1344
 Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
 435 440 445
 gtg aag agc gtg cgg gag gcg gcc gag cgc atg gcc ttc aac atg ccc 1392
 Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
 450 455 460
 gtc cag ggc acc gcc gcc gac ctc atg aag ctg gct atg gtg aag ctc 1440
 Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
 465 470 475 480
 ttc ccc agg ctg gag gaa atg ggg gcc agg atg ctc ctt cag gtc cac 1488
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
 485 490 495
 gac gag ctg gtc ctc gag gcc cca aaa gag agg gcg gag gcc gtg gcc 1536
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 500 505 510
 cgg ctg gcc aag gag gtc atg gag ggg gtg tat ccc ctg gcc gtg ccc 1584
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 515 520 525
 ctg gag gtg gag gtg ggg ata ggg gag gac tgg ctc tcc gcc aag gag 1632
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 530 535 540
 taa tga 1638

<210> 2

<211> 544

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TaqD288_D-2, Faktor Xa-geschnitten

ES 2 278 249 T3

<400> 2

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

ES 2 278 249 T3

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
165 170 175

5

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
180 185 190

10

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
195 200 205

15

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
210 215 220

20

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
225 230 235 240

25

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
245 250 255

30

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
260 265 270

35

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
275 280 285

40

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
290 295 300

45

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
305 310 315 320

50

Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
325 330 335

55

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
340 345 350

60

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
355 360 365

65

ES 2 278 249 T3

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
370 375 380

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
385 390 395 400

Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
405 410 415

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
420 425 430

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
435 440 445

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
450 455 460

Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
465 470 475 480

Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
485 490 495

Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
500 505 510

Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
515 520 525

Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
530 535 540

<210> 3

<211> 1641

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TaqD288_E (sin cola de histidinas N-terminal)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1641)

<220>

<221> misc-feature

ES 2 278 249 T3

<222> (1)..(1641)

<223> TaqDelta288 con metionina N-terminal

5 <400> 3

10	atg gaa agc ccc aag gcc ctg gag gag gcc ccc tgg ccc ccg ccg gaa	48
	Met Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Glu	
	1 5 10 15	
15	ggg gcc ttc gtg ggc ttt gtg ctt tcc cgc aag gag ccc atg tgg gcc	96
	Gly Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala	
	20 25 30	
20	gat ctt ctg gcc ctg gcc gcc gcc agg ggg ggc cgg gtc cac cgg gcc	144
	Asp Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala	
	35 40 45	
25	ccc gag cct tat aaa gcc ctc agg gac ctg aag gag gcg cgg ggg ctt	192
	Pro Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu	
	50 55 60	
30	ctc gcc aaa gac ctg agc gtt ctg gcc ctg agg gaa ggc ctt ggc ctc	240
	Leu Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu	
	65 70 75 80	
35	ccg ccc ggc gac gac ccc atg ctc ctc gcc tac ctc ctg gac cct tcc	288
	Pro Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser	
	85 90 95	
40	aac acc acc ccc gag ggg gtg gcc cgg cgc tac ggc ggg gag tgg acg	336
	Asn Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr	
	100 105 110	
45	gag gag gcg ggg gag cgg gcc gcc ctt tcc gag agg ctc ttc gcc aac	384
	Glu Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn	
	115 120 125	
50	ctg tgg ggg agg ctt gag ggg gag gag agg ctc ctt tgg ctt tac cgg	432
	Leu Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg	
	130 135 140	
55	gag gtg gag agg ccc ctt tcc gct gtc ctg gcc cac atg gag gcc acg	480
	Glu Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr	
	145 150 155 160	

ES 2 278 249 T3

5	ggg gtg cgc ctg gac gtg gcc tat ctc agg gcc ttg tcc ctg gag gtg Gly Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val 165 170 175	528
10	gcc gag gag atc gcc cgc ctc gag gcc gag gtc ttc cgc ctg gcc ggc Ala Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly 180 185 190	576
15	cac ccc ttc aac ctc aac tcc cgg gac cag ctg gaa agg gtc ctc ttt His Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe 195 200 205	624
20	gac gag cta ggg ctt ccc gcc atc ggc aag acg gag aag acc ggc aag Asp Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys 210 215 220	672
25	cgc tcc acc agc gcc gcc gtc ctg gag gcc ctc cgc gag gcc cac ccc Arg Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro 225 230 235 240	720
30	atc gtg gag aag atc ctg cag tac cgg gag ctc acc aag ctg aag agc Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser 245 250 255	768
35	acc tac att gac ccc ttg ccg gac ctc atc cac ccc agg acg ggc cgc Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg 260 265 270	816
40	ctc cac acc cgc ttc aac cag acg gcc acg gcc acc ggc agg cta agt Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser 275 280 285	864
45	agc tcc gat ccc aac ctc cag aac atc ccc gtc cgc acc ccg ctt ggg Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly 290 295 300	912
50	cag agg atc cgc cgg gcc ttc atc gcc gag gag ggg tgg cta ttg gtg Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val 305 310 315 320	960
55	gcc ctg gac tat agc cag ata gag ctc agg gtg ctg gcc cac ctc tcc Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser 325 330 335	1008
60	ggc gac gag aac ctg atc cgg gtc ttc cag gag ggg cgg gac atc cac Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His 340 345 350	1056
65	acg gag acc gcc agc tgg atg ttc ggc gtc ccc cgg gag gcc gtg gac Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp 355 360 365	1104
	ccc ctg atg cgc cgg gcg gcc aag acc atc aac ttc ggg gtc ctc tac Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr 370 375 380	1152
	ggc atg tgg gcc cac cgc ctc tcc cag gag cta gcc atc cct tac gag Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu 385 390 395 400	1200

ES 2 278 249 T3

	gag gcc cag gcc ttc att gag cgc tac ttt cag agc ttc ccc aag gtg	1248
	Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val	
5	405 410 415	
	cgg gcc tgg att gag aag acc ctg gag gag ggc agg agg cgg ggg tac	1296
	Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr	
10	420 425 430	
	gtg gag acc ctc ttc ggc cgc cgc cgc tac gtg cca gac cta gag gcc	1344
	Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala	
15	435 440 445	
	cgg gtg aag agc gtg cgg gag ggc gcc gag cgc atg gcc ttc aac atg	1392
	Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met	
20	450 455 460	
	ccc gtc cag ggc acc gcc gcc gac ctc atg aag ctg gct atg gtg aag	1440
	Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys	
25	465 470 475 480	
	ctc ttc ccc agg ctg gag gaa atg ggg gcc agg atg ctc ctt cag gtc	1488
	Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val	
30	485 490 495	
	cac gac gag ctg gtc ctc gag gcc cca aaa gag agg gcg gag gcc gtg	1536
	His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val	
35	500 505 510	
	gcc cgg ctg gcc aag gag gtc atg gag ggg gtg tat ccc ctg gcc gtg	1584
	Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val	
40	515 520 525	
	ccc ctg gag gtg gag gtg ggg ata ggg gag gac tgg ctc tcc gcc aag	1632
	Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys	
45	530 535 540	
	gag taa tga	1641
	Glu	
	545	

<210> 4

<211> 545

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TaqD288_E (sin cola de histidinas N-terminal)

ES 2 278 249 T3

<400> 4

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

ES 2 278 249 T3

Ile Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser
 245 250 255
 5
 Thr Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg
 260 265 270
 10
 Leu His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser
 275 280 285
 15
 Ser Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly
 290 295 300
 20
 Gln Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val
 305 310 315 320
 25
 Ala Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser
 325 330 335
 30
 Gly Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His
 340 345 350
 35
 Thr Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp
 355 360 365
 40
 Pro Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr
 370 375 380
 45
 Gly Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu
 385 390 395 400
 50
 Glu Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val
 405 410 415
 55
 Arg Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr
 420 425 430
 60
 Val Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala
 435 440 445
 65
 Arg Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met
 450 455 460

ES 2 278 249 T3

Pro Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys
 465 470 475 480

5

Leu Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val
 485 490 495

10

His Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val
 500 505 510

15

Ala Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val
 515 520 525

20

Pro Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys
 530 535 540

25

Glu
 545

<210> 5
 <211> 558
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> TaqD288_D-2
 <220>
 <221> MISC-FEATURE
 <223> TaqDelta288 con cola de histidinas en el extremo N-terminal y el sitio de escisión de la proteasa factor X.
 <400> 5

30

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg Glu Ser
 1 5 10 15

45

Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly Ala Phe
 20 25 30

50

Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp Leu Leu
 35 40 45

55

60

65

ES 2 278 249 T3

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

ES 2 278 249 T3

	Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asp	
	290	295 300
5	Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln Arg Ile	
	305	310 315 320
10	Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala Leu Asp	
	325	330 335
15	Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly Asp Glu	
	340	345 350
20	Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr Glu Thr	
	355	360 365
25	Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro Leu Met	
	370	375 380
30	Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly Met Ser	
	385	390 395 400
35	Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu Ala Gln	
	405	410 415
40	Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg Ala Trp	
	420	425 430
45	Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val Glu Thr	
	435	440 445
50	Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg Val Lys	
	450	455 460
55	Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro Val Gln	
	465	470 475 480
60	Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu Phe Pro	
	485	490 495
65	Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His Asp Glu	
	500	505 510

ES 2 278 249 T3

Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala Arg Leu
515 520 525

5

Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro Leu Glu
530 535 540

10

Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
545 550 555

15 <210> 6

<211> 2499

<212> DNA

20 <213> *Thermus aquaticus*

<220>

<221> misc-feature

<223> marco de lectura abierto que codifica la DNA polimerasa (Taq) de *Thermus aquaticus*.

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(2499)

30 <400> 6

atg agg ggg atg ctg ccc ctc ttt gag ccc aag ggc cgg gtc ctc ctg 48
35 Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
1 5 10 15

gtg gac ggc cac cac ctg gcc tac cgc acc ttc cac gcc ctg aag ggc 96
40 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
20 25 30

ctc acc acc agc cgg ggg gag ccg gtg cag gcg gtc tac gcc ttc gcc 144
Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
35 40 45

aag agc ctc ctc aag gcc ctc aag gag gac ggg gac gcg gtg atc gtg 192
Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
50 55 60

gtc ttt gac gcc aag gcc ccc tcc ttc cgc cac gag gcc tac ggg ggg 240
50 Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
65 70 75 80

55

60

65

ES 2 278 249 T3

	tac aag gcg ggc cgg gcc ccc acg ccg gag gac ttt ccc cgg caa ctc	288
	Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu	
	85 90 95	
5	gcc ctc atc aag gag ctg gtg gac ctc ctg ggg ctg gcg cgc ctc gag	336
	Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu	
	100 105 110	
10	gtc ccg ggc tac gag gcg gac gac gtc ctg gcc agc ctg gcc aag aag	384
	Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys	
	115 120 125	
15	gcg gaa aag gag ggc tac gag gtc cgc atc ctc acc gcc gac aaa gac	432
	Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp	
	130 135 140	
20	ctt tac cag ctc ctt tcc gac cgc atc cac gtc ctc cac ccc gag ggg	480
	Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly	
	145 150 155 160	
25	tac ctc atc acc ccg gcc tgg ctt tgg gaa aag tac ggc ctg agg ccc	528
	Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro	
	165 170 175	
30	gac cag tgg gcc gac tac ccg gcc ctg acc ggg gac gag tcc gac aac	576
	Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn	
	180 185 190	
35	ctt ccc ggg gtc aag ggc atc ggg gag aag acg gcg agg aag ctt ctg	624
	Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu	
	195 200 205	
40	gag gag tgg ggg agc ctg gaa gcc ctc ctc aag aac ctg gac cgg ctg	672
	Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu	
	210 215 220	
45	aag ccc gcc atc ccg gag aag atc ctg gcc cac atg gac gat ctg aag	720
	Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys	
	225 230 235 240	
50	ctc tcc tgg gac ctg gcc aag gtg cgc acc gac ctg ccc ctg gag gtg	768
	Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val	
	245 250 255	
55	gac ttc gcc aaa agg ccg gag ccc gac ccg gag agg ctt agg gcc ttt	816
	Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe	
	260 265 270	
60	ctg gag agg ctt gag ttt ggc agc ctc ctc cac gag ttc ggc ctt ctg	864
	Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu	
	275 280 285	
65	gaa agc ccc aag gcc ctg gag gag gcc ccc tgg ccc ccg ccg gaa ggg	912
	Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly	
	290 295 300	
70	gcc ttc gtg ggc ttt gtg ctt tcc cgc aag gag ccc atg tgg gcc gat	960
	Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp	
	305 310 315 320	

ES 2 278 249 T3

	ctt ctg gcc ctg gcc gcc gcc agg ggg ggc cgg gtc cac cgg gcc ccc	1008
	Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro	
	325 330 335	
5	gag cct tat aaa gcc ctc agg gac ctg aag gag gcg cgg ggg ctt ctc	1056
	Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu	
	340 345 350	
10	gcc aaa gac ctg agc gtt ctg gcc ctg agg gaa ggc ctt ggc ctc ccg	1104
	Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro	
	355 360 365	
15	ccc ggc gac gac ccc atg ctc ctc gcc tac ctc ctg gac cct tcc aac	1152
	Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn	
	370 375 380	
20	acc acc ccc gag ggg gtg gcc cgg cgc tac ggc ggg gag tgg acg gag	1200
	Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu	
	385 390 395 400	
25	gag gcg ggg gag cgg gcc gcc ctt tcc gag agg ctc ttc gcc aac ctg	1248
	Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu	
	405 410 415	
30	tgg ggg agg ctt gag ggg gag gag agg ctc ctt tgg ctt tac cgg gag	1296
	Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu	
	420 425 430	
35	gtg gag agg ccc ctt tcc gct gtc ctg gcc cac atg gag gcc acg ggg	1344
	Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly	
	435 440 445	
40	gtg cgc ctg gac gtg gcc tat ctc agg gcc ttg tcc ctg gag gtg gcc	1392
	Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala	
	450 455 460	
45	gag gag atc gcc cgc ctc gag gcc gag gtc ttc cgc ctg gcc ggc cac	1440
	Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His	
	465 470 475 480	
50	ccc ttc aac ctc aac tcc cgg gac cag ctg gaa agg gtc ctc ttt gac	1488
	Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp	
	485 490 495	
55	gag cta ggg ctt ccc gcc atc ggc aag acg gag aag acc ggc aag cgc	1536
	Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg	
	500 505 510	
60	tcc acc agc gcc gcc gtc ctg gag gcc ctc cgc gag gcc cac ccc atc	1584
	Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile	
	515 520 525	
65	gtg gag aag atc ctg cag tac cgg gag ctc acc aag ctg aag agc acc	1632
	Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr	
	530 535 540	

ES 2 278 249 T3

	tac att gac ccc ttg ccg gac ctc atc cac ccc agg acg ggc cgc ctc	1680
	Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu	
	545 550 555 560	
5	cac acc cgc ttc aac cag acg gcc acg gcc acg ggc agg cta agt agc	1728
	His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser	
	565 570 575	
10	tcc gat ccc aac ctc cag aac atc ccc gtc cgc acc ccg ctt ggg cag	1776
	Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln	
	580 585 590	
15	agg atc cgc cgg gcc ttc atc gcc gag gag ggg tgg cta ttg gtg gcc	1824
	Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala	
	595 600 605	
20	ctg gac tat agc cag ata gag ctc agg gtg ctg gcc cac ctc tcc ggc	1872
	Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly	
	610 615 620	
25	gac gag aac ctg atc cgg gtc ttc cag gag ggg cgg gac atc cac acg	1920
	Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr	
	625 630 635 640	
30	gag acc gcc agc tgg atg ttc ggc gtc ccc cgg gag gcc gtg gac ccc	1968
	Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro	
	645 650 655	
35	ctg atg cgc cgg gcg gcc aag acc atc aac ttc ggg gtc ctc tac ggc	2016
	Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly	
	660 665 670	
40	atg tgg gcc cac cgc ctc tcc cag gag cta gcc atc cct tac gag gag	2064
	Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu	
	675 680 685	
45	gcc cag gcc ttc att gag cgc tac ttt cag agc ttc ccc aag gtg cgg	2112
	Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg	
	690 695 700	
50	gcc tgg att gag aag acc ctg gag gag ggc agg agg cgg ggg tac gtg	2160
	Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val	
	705 710 715 720	
55	gag acc ctc ttc ggc cgc cgc cgc tac gtg cca gac cta gag gcc cgg	2208
	Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg	
	725 730 735	
60	gtg aag agc gtg cgg gag gcg gcc gag cgc atg gcc ttc aac atg ccc	2256
	Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro	
	740 745 750	
65	gtc cag ggc acc gcc gcc gac ctc atg aag ctg gct atg gtg aag ctc	2304
	Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu	
	755 760 765	

ES 2 278 249 T3

ttc ccc agg ctg gag gaa atg ggg gcc agg atg ctc ctt cag gtc cac 2352
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
 770 775 780
 5
 gag gag ctg gtc ctc gag gcc cca aaa gag agg gcg gag gcc gtg gcc 2400
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 785 790 795 800
 10
 cgg ctg gcc aag gag gtc atg gag ggg gtg tat ccc ctg gcc gtg ccc 2448
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 805 810 815
 15
 ctg gag gtg gag gtg ggg ata ggg gag gac tgg ctc tcc gcc aag gag 2496
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830
 tga 2499
 20
 <219> 7
 <211> 832
 25 <212> PRT
 <213> *Thermus aquaticus*
 <400> 7
 30
 Met Arg Gly Met Leu Pro Leu Phe Glu Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu
 1 5 10 15
 35
 Val Asp Gly His His Leu Ala Tyr Arg Thr Phe His Ala Leu Lys Gly
 20 25 30
 40
 Leu Thr Thr Ser Arg Gly Glu Pro Val Gln Ala Val Tyr Gly Phe Ala
 35 40 45
 45
 Lys Ser Leu Leu Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Asp Ala Val Ile Val
 50 55 60
 50
 Val Phe Asp Ala Lys Ala Pro Ser Phe Arg His Glu Ala Tyr Gly Gly
 65 70 75 80
 55
 Tyr Lys Ala Gly Arg Ala Pro Thr Pro Glu Asp Phe Pro Arg Gln Leu
 85 90 95
 60
 Ala Leu Ile Lys Glu Leu Val Asp Leu Leu Gly Leu Ala Arg Leu Glu
 100 105 110
 65

ES 2 278 249 T3

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

ES 2 278 249 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

ES 2 278 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 278 249 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido Flu T-14; molde de DNA para el cribado de mutantes de la DNA polimerasa termoestables; la T de la posición 14 está marcada con fluoresceína.

<220>

30

<221> misc-feature

<222> (14)..(14)

<223> marcado con fluoresceína

35

<400> 8

tcgattcggg acgtccgcgc gatcgggcgca tatagcgccg atcgcgacg tac

53

40

45

50

55

60

65