



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CINVESTAV IRAPUATO

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

“Evaluación de cinco diferentes enzimas ADN
polimerasas, para realizar amplificación por
desplazamiento de hebra”

TESIS QUE PRESENTA

IBT. JESÚS GABRIEL ZENDEJAS SÁNCHEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad de Biotecnología de Plantas

Director de Tesis: Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Irapuato, Guanajuato

Julio, 2017

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica Estructural del LANGEBIO-CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Doctor Luis Gabriel Briebe de Castro, Profesor Titular del LANGEBIO-CINVESTAV-IPN y con la asesoría del Doctor Octavio Martínez de la Vega, Profesor Titular del LANGEBIO-CINVESTAV-IPN, y el Doctor Robert Winkler, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biotecnología.

Agradezco a CONACYT por la beca 587931 otorgada para la realización de estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias con Especialidad de Biotecnología de Plantas del LANGEBIO-CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Agradezco el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social FOSISS-CONACYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto “Validación de un Sistema de Detección de Agentes Infecciosos de Importancia Clínica por Medio de la Amplificación del DNA Isotérmico” con Clave 261354 y Convenio I000/890/2015 al Dr. Luis G. Briebea.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Estructural por su apoyo, consejos y amistad durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco al Doctor Luis Gabriel Briebea de Castro por el conocimiento y las experiencias que adquirí a lo largo de mi estadía en el Laboratorio de Bioquímica Estructural, gracias a este proceso crecí personal y profesionalmente.

Agradezco a Corina Díaz por todo su apoyo técnico y conocimientos.

Por último y más importante, agradezco a mis padres y a mi esposa por su apoyo incondicional a lo largo de la duración de este proyecto, no lo habría logrado sin sus consejos y ayuda.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.	6.
Abstract.	7.
1. INTRODUCCIÓN.	8.
1.1 ADN Polimerasas.	8.
1.2 Clasificación de las ADN polimerasas.	9.
1.3 Características estructurales de las ADNP.	11.
1.4 Phi29 como modelo de estudio.	14.
1.5 Inserciones TPR1 y TPR2.	14.
1.6 EL PCR.	15.
2. AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA.	17.
2.1 Métodos de amplificación isoterma: Amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP).	17.
2.2 Métodos de amplificación isoterma: Amplificación por círculo rodante (RCA).	20.
2.3 Métodos de amplificación isoterma: Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA).	21.
3. LAS 5 PROTEÍNAS ESTUDIADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.	24.
3.1 <i>Exiguobacterium antarcticum</i> .	24.
3.2 <i>MSBL1 Archaeon</i> .	24.
3.3 <i>Methanocella arvoryzae</i> .	25.
3.4 <i>Nitrosopumilus sp.</i>	25.
3.5 <i>Thermotoga sp.</i>	25.
4. HIPÓTESIS.	26.
5. OBJETIVOS.	26.
5.1 Objetivo General.	26.
5.2 Objetivos Específicos.	26.
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	27.
6.1 Análisis filogenético y modelos estructurales de las polimerasas de <i>Exiguobacterium antarcticum</i> , <i>MSBL1 Archaeon</i> , <i>Methanocella arvoryzae</i> ,	

<i>Nitrosopumilus sp</i> y <i>Thermotoga sp</i> .	28.
6.2 Sub-clonado de los genes en pET19.	28.
6.3 Expresión y Purificación de <i>Exiguobacterium antarcticum</i> , <i>MSBL1</i> <i>Archaeon</i> , <i>Methanocella arvoryzae</i> , <i>Nitrosopumilus sp.</i> y <i>Thermotoga sp</i> .	32.
6.4 Ensayo de polimerización.	33.
6.5 Ensayo de amplificación por desplazamiento de hebra.	35.
7. RESULTADOS.	37.
7.1 Análisis filogenético y modelos estructurales de las polimerasas de <i>Exiguobacterium antarcticum</i> , <i>MSBL1</i> <i>Archaeon</i> , <i>Methanocella arvoryzae</i> , <i>Nitrosopumilus sp</i> y <i>Thermotoga sp</i> .	37.
7.2 Sub-clonado de los genes en pET19.	41.
7.3 Expresión y Purificación de <i>Exiguobacterium antarcticum</i> , <i>MSBL1</i> <i>Archaeon</i> , <i>Methanocella arvoryzae</i> , <i>Nitrosopumilus sp.</i> y <i>Thermotoga sp</i> .	42.
7.4 <i>Exiguobacterium antarcticum</i> y <i>Methanocella arvoryzae</i> realizan polimerización y tienen actividad de desplazamiento de hebra moderado, mientras que <i>Thermotoga sp.</i> , realiza polimerización y cuenta con actividad exonucleasa.	43.
8. DISCUSIÓN.	46.
9. CONCLUSIÓN.	49.
10. PERSPECTIVAS.	50.
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	51.
12. APÉNDICES.	56.
12.1 Secuencias de aminoácidos de las cinco enzimas ADN polimerasas del presente estudio.	56.
12.2 Motivos TPR2 de las 22 ADN polimerasas representadas en el árbol filogenético.	58.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mecanismo de polimerización.	8.
Figura 2. ADN polimerasas de las familias A, B, C, X e Y.	11.
Figura 3. 5 familias de ADN Polimerasas.	13.
Figura 4. A) Representación esquemática de la polimerasa Phi29 con sustrato. B) Modelo detallado de la horquilla de replicación de la ADN polimerasa Phi29.	15.
Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de LAMP.	19.
Figura 6. Principio de la amplificación por círculo rodante.	21.
Figura 7. La reacción del MDA.	22.
Figura 8. Enlaces internucleotídicos fosfodiéster y fosforotioato.	23.
Figura 9. Esquema general del procedimiento efectuado en el presente trabajo.	27.
Figura 10. Árbol filogenético de diversos integrantes de la Familia B2.	37.
Figura 11. Representación modular de las polimerasas de Phi29, <i>Exiguobacterium antarcticum</i> , <i>MSBL1 Archaeon</i> , <i>Methanocella arvoryzae</i> , <i>Nitrosopumilus sp</i> y <i>Thermotoga sp</i> .	39.
Figura 12. ADN Polimerasas de <i>Exiguobacterium antarcticum</i> , <i>MSBL1 Archaeon</i> , <i>Methanocella arvoryzae</i> , <i>Nitrosopumilus sp</i> , <i>Thermotoga sp</i> . y Phi29.	40.
Figura 13. Gel de clonación de N- <i>Nitrosopumilus sp.</i> , A- <i>MSBL1 Archaeon</i> , T- <i>Thermotoga sp.</i> , E- <i>Exiguobacterium antarcticum</i> y M- <i>Methanocella arvoryzae</i> en pET19.	41.
Figura 14. Gel de acrilamida de la purificación definitiva.	42.
Figura 15. Actividad enzimática de <i>Thermotoga sp.</i> , <i>Exiguobacterium antarcticum</i> y <i>Methanocella arvoryzae</i> .	44.
Figura 16. Amplificación por desplazamiento múltiple de A) CITO. B) pUC19.	45.

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Componentes de la digestión de los 5 genes para 15 µl de reacción.	30.
Tabla 2. Componentes de la ligación de los 5 genes a pET19, para 15 µl de reacción.	31.
Tabla 3. Componentes de las Reacciones de amplificación por desplazamiento de hebra Para 10 µl de reacción.	35.
Tabla 4. Parámetros de las polimerasas Phi29 <i>Thermotoga sp.</i> , <i>Exiguobacterium antarcticum</i> y <i>Methanocella arvoryzae</i> .	42.

RESUMEN.

En el presente trabajo se evalúan cinco diferentes enzimas ADN polimerasas, todas ellas pertenecientes a la familia "B"; dichas enzimas han sido extraídas tanto de bacterias: *Exiguobacterium antarcticum* y *Thermotoga sp.*, como de arqueas: *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp.* y *MSBL1 Archaeon*.

Las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum* y *Thermotoga sp.* contienen un motivo TPR2 de mayor longitud al de Phi29; (casi el doble). Las de *Methanocella arvoryzae* y de *MSBL1 Archaeon* son muy cercanas en tamaño al motivo de Phi29, mientras que el motivo de *Nitrosopumilus sp.* es cuatro veces menor al de Phi29.

La diferencia en longitud de los motivos TPR2, lleva implícita una mejor o peor unión al ADN, y como consecuencia de ello, se reflejará en una efectividad diferenciada para la polimerización.

Se encontró que de los cinco candidatos que conforman el presente estudio, las polimerasas de *Methanocella*, *Thermotoga* y de *Exiguobacterium* son capaces de efectuar polimerización. *Methanocella* la realiza por un rango de temperaturas desde 35°C hasta 95°C; sin embargo, a 95° no polimeriza totalmente el sustrato de los 24 hasta los 45 nucleótidos; *Thermotoga* la realiza de la misma manera que *Methanocella*, mientras que *Exiguobacterium* la realiza desde los 35°C hasta los 95°C, pero en ninguna de las cuatro temperaturas evaluadas polimeriza completamente de los 24 hasta los 45 nucleótidos. *Methanocella* y *Exiguobacterium* son capaces de efectuar amplificación por desplazamiento de hebra a 30°, 50° y 70°C y únicamente la polimerasa *Thermotoga* muestra actividad exonucleasa.

A pesar que aún falta profundizar más en los procesos y efectuar más evaluaciones para validar de una mejor manera los resultados obtenidos, lo anterior podría servir para elegir una enzima ADN polimerasa que supliera ya sea a la Taq polimerasa o a la polimerasa de Phi29 como la enzima elegida para realizar una amplificación del ADN.

ABSTRACT.

In the present work, five different DNA polymerases belonging to the “B” Family are presented. These polymerases were obtained from Bacteria: *Exiguobacterium antarcticum* and *Thermotoga sp.*; and Archaea: *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp.* and *MSBL1 Archaeon*. *Exiguobacterium antarcticum* and *Thermotoga sp.* polymerases contain a motif TPR2 of a bigger length than that of the Phi29 TPR2 motif (almost double in size); *Methanocella arvoryzae* and *MSBL1 Archaeon* polymerases are very close in size to that of Phi29 TPR2 motif; while *Nitrosopumilus sp.* motif is much shorter than that of Phi29 TPR2 motif (4 times shorter).

Such difference in the length of the TPR2 motifs can result in a better or a worse bonding with the DNA, and therefore a different effectiveness in their ability to perform polymerization.

From the five candidates, it was found that the polymerases of *Methanocella*, *Thermotoga* and *Exiguobacterium* can perform polymerization. *Methanocella* polymerizes in several temperatures ranging from 35°C to 95°C, although at 95°C it cannot perform a total polymerization of the substrate of 24 nucleotides to 45 nucleotides. *Thermotoga* performs polymerization in the same way that *Methanocella*, while *Exiguobacterium* performs polymerization from 35°C to 95°C, but in none of the four temperatures that were tested, can it polymerize completely from 24 to 45 nucleotides. *Methanocella* and *Exiguobacterium* perform Strand Displacement Amplification at 30°, 50° and 70°C, with *Thermotoga* being the only that exhibits exonuclease activity.

Despite the fact that the processes needs to be perfected and some evaluations pending in order to validate in a better way the results obtained, the previous could be useful to choose a different DNA polymerase enzyme that could serve as a replacement for Taq polymerase or Phi29 polymerase, as the enzyme chosen for DNA amplifications.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ADN Polimerasas.

Las enzimas que efectúan la adición de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) en el extremo 3' de una cadena templado son las ADN polimerasas. Dicho proceso se ilustra en la figura 1. Las polimerasas tienen como meta principal la replicación del genoma de manera precisa y eficiente, para así asegurar el mantenimiento de la información genética y su fiel transmisión de una generación a otra. Aunque ésta no es su única tarea; ya que tienen un muy importante papel en las rutas de reparación de daños. Existen cinco ADN polimerasas en *Escherichia coli*, ocho ADN polimerasas en *Saccharomyces cerevisiae*, al menos quince ADN polimerasas en el humano y al menos doce ADN polimerasas en *Arabidopsis thaliana* [1].

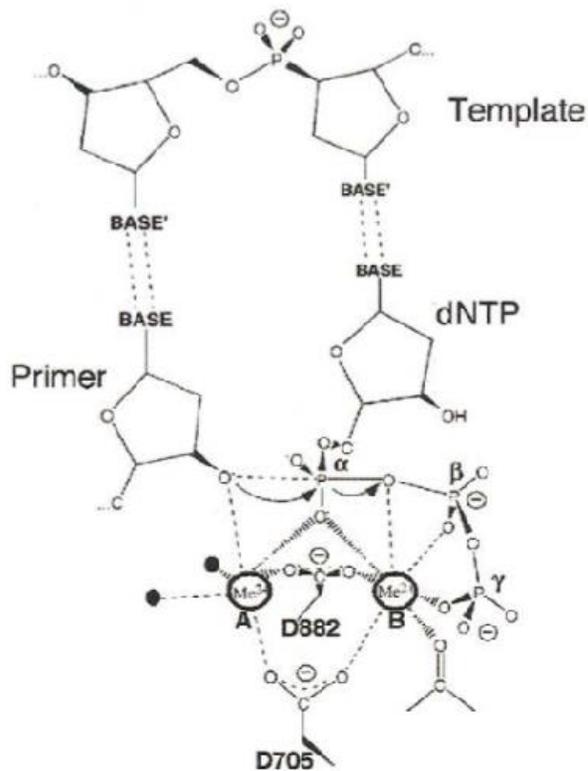


Figura 1. Mecanismo de polimerización. Se lleva a cabo por un ataque nucleofílico del grupo -OH del extremo 3' del iniciador sobre el fosfato α del nucleótido entrante. El ión metálico divalente A, participa en la desprotonación del -OH facilitando del ataque nucleofílico, mientras que el ión B interacciona con los fosfatos β y γ . Se adiciona un nucleótido al iniciador y se libera PPi (Tomado de [2]).

Las ADN polimerasas difieren en sus propiedades catalíticas tales como procesividad (que se refiere a cuántos nucleótidos se pueden agregar a la cadena en un solo evento antes de la disociación de la polimerasa al templado) y la fidelidad (la cual se refiere a que una polimerasa pueda agregar el nucleótido correcto en el momento correcto). Debido a éstas diferencias las polimerasas pueden actuar en diferentes procesos: reparación, replicación o recombinación [3].

1.2 Clasificación de las ADN polimerasas.

Las ADN polimerasas se clasifican en seis grandes familias:

Las polimerasas agrupadas en la familia “A”, tienen como modelo a la polimerasa ADN Pol I de *E. coli*, cuya tarea es la reparación del ADN y la maduración de los fragmentos de Okazaki (que se refieren a las cadenas cortas de ADN recién sintetizadas en la hebra discontinua), así como otras dos actividades adicionales; las de polimerización, exonucleasa de $3' \rightarrow 5'$ y de $5' \rightarrow 3'$. La primera está conservada en varias polimerasas de la familia A y se le conoce como actividad correctora debido a que tiene la capacidad de remover nucleótidos mal insertados por la polimerasa. En esta familia existen polimerasas de bacterias (*E. coli*), bacteriófagos (T7) y eucariontes (Pol γ) [1].

En la familia “B” se encuentran las principales enzimas replicativas en organismos eucariontes. La mayoría de las enzimas de esta familia tienen la actividad exonucleasa de $3' \rightarrow 5'$, contrario a miembros de otras familias, las polimerasas de la familia “B”, se caracterizan por poseer varias sub-unidades. En la familia “B” se encuentran polimerasas de bacteriófagos (T4, Phi29) y de eucariontes (α , δ , ζ y ϵ) [1]. La familia B se subdivide a su vez en la subfamilia B1 y B2 en base al primer que utilizan para dar inicio a la síntesis de ADN. La subfamilia B1 utiliza tanto ADN como ARN, tal y como lo hacen la mayoría de las polimerasas, mientras que la subfamilia B2 utiliza una proteína especial conocida como “proteína terminal” [4]. Las polimerasas de la subfamilia B2 pueden utilizar a las mencionadas proteínas terminales como indicadores de la síntesis de ADN debido a que tienen dos inserciones específicas en su parte C-terminal; dichas inserciones se encuentran

entre las regiones conservadas A y B del dominio de polimerización (en el caso del TPR1) y entre las regiones B y C del dominio de polimerización (en el caso del TPR2) [5].

La familia "C" tiene como modelo a la ADN polimerasa III de *E. coli*; dentro de la familia están polimerasas homólogas presentes en la mayoría de bacterias Gram positivas [6].

La familia "D" comprende a ADN polimerasas presentes sólo en *Archaea*, así como en una nueva clase de ADN polimerasas, relacionadas a primasas de archaea, ya identificadas en bacterias [1].

Las ADN polimerasas de la familia "X" son monoméricas y pequeñas, y participan en el llenado de huecos durante la reparación del ADN. Un rasgo característico presente en la mayoría de los integrantes de este grupo, es la presencia de un dominio de unión al ADN N-terminal de 8 kb, el cual, facilita la unión a sustratos con huecos en la secuencia. Otra característica interesante es que miembros de la familia "X", están presentes en organismos carentes de un sistema inmune como bacterias, virus y levaduras. Debido a lo anterior, se piensa que su papel está asociado con la reparación del ADN [1].

Las polimerasas englobadas dentro de la familia "Y", además de ser las más recientemente identificadas, se caracterizan porque ninguna de ellas tiene actividad exonucleasa. Poseen un dominio llamado de muñeca o de dedos pequeños, que al parecer está involucrado en la modulación de su especificidad hacia algún sustrato, tienen una baja fidelidad en la síntesis de ADN sin daños. Su característica más importante, es poseer un dominio no tan rígido de unión al ADN, lo que permite el acomodo de estructuras distorsionadas de ADN en su sitio catalítico, resultando en su habilidad de polimerizar ADN dañado (síntesis translesión) [1].

Se muestran en la figura 2 algunos ejemplos específicos de cinco de las seis familias de ADN polimerasas, así como sus dominios.

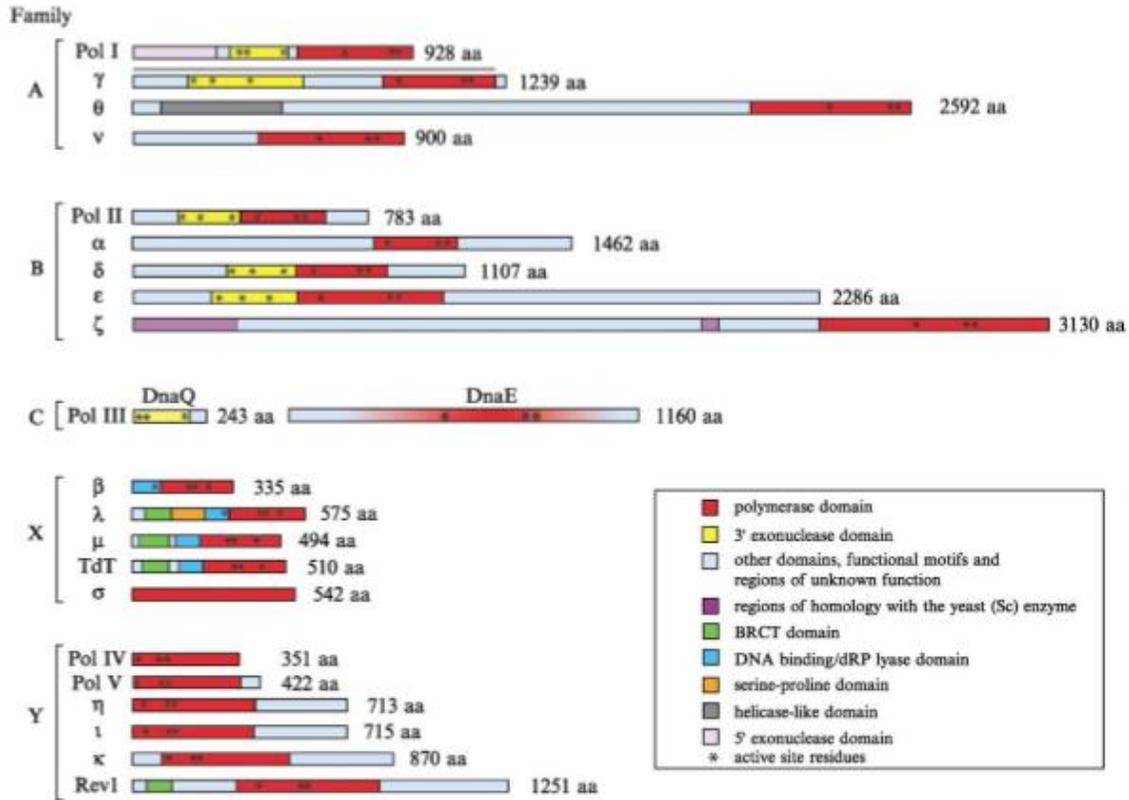


Figura 2. ADN polimerasas de las familias A, B, C, X e Y. Se muestran polimerasas específicas de cada una de las 5 familias mencionadas con sus distintos dominios, así como sus tamaños en amino ácidos (tomado de [7]).

1.3 Características estructurales de las ADNP.

De manera interesante, a pesar de no tener una gran similitud en sus secuencias, la estructura general de la mayoría de estas enzimas ADN polimerasas, comparten características similares. En todos los casos el dominio catalítico se puede ver como se ilustra en la figura 3; similar al de una mano derecha, con subdominios de dedos, palma y pulgar, los cuales contribuyen a la unión del dNTP al primer-templado. Así mismo, en todos los casos, el subdominio de la palma contiene los tres residuos catalíticos esenciales para la polimerización. Más allá de revelar el plegamiento general de una proteína, los estudios estructurales de ADN polimerasas incrementan el conocimiento que se tiene a nivel atómico de la naturaleza de la interacción de la polimerasa con ADN normal y dañado, así como las propiedades específicas de cada polimerasa o de su mecanismo de mutagénesis.

Para lograr entender de una manera precisa las funciones de una polimerasa de cualquier familia, no es suficiente el estudio de un modelo representativo, ello debido a que las enzimas ADN polimerasas de una misma familia comúnmente presentan propiedades distintas a la misma, tales como procesividad, fidelidad o especificidad por un sustrato; siendo dichas diferencias el resultado de cambios sutiles en las estructuras [1].

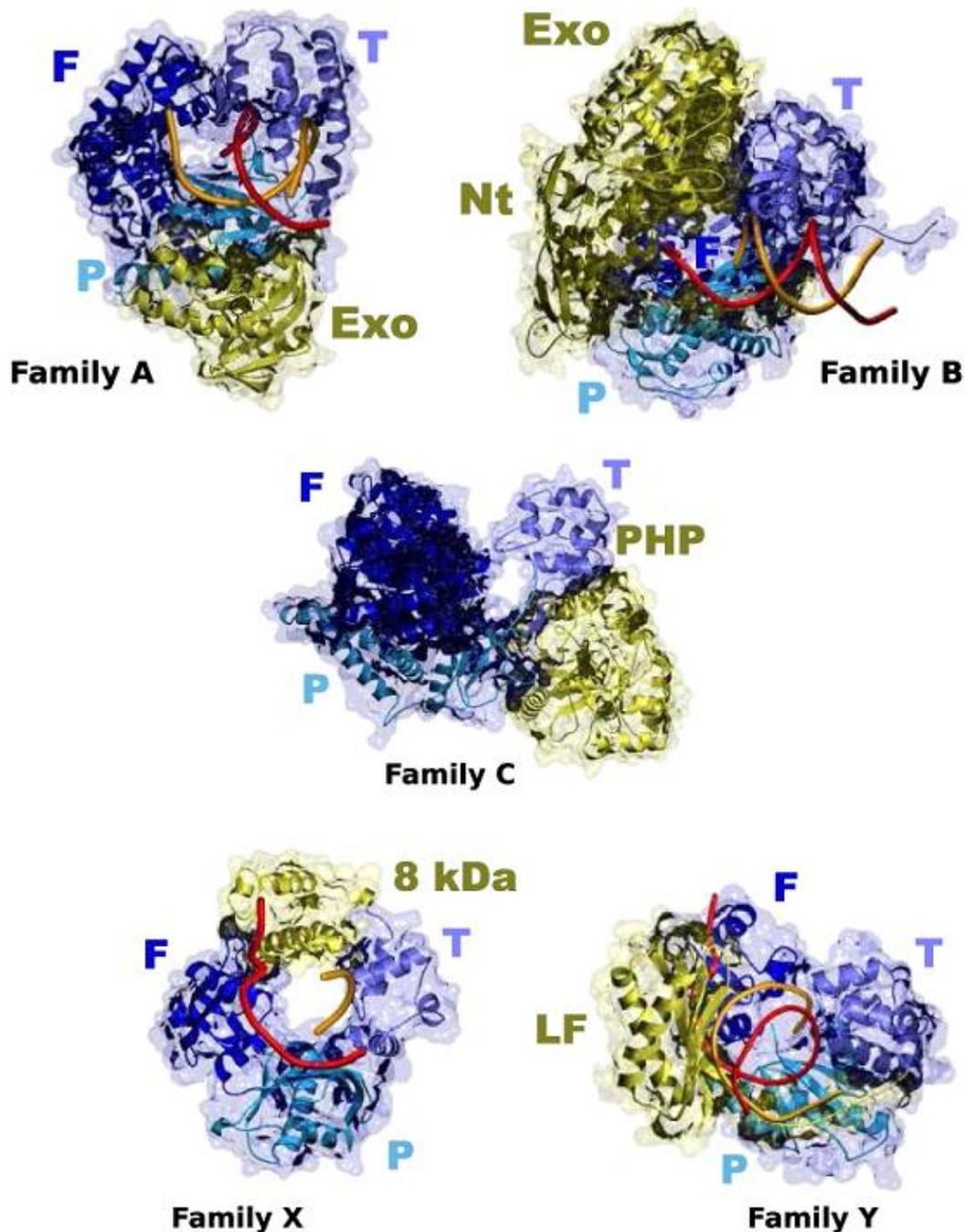


Figura 3. 5 familias de ADN Polimerasas. Estructuras cristalizadas de un miembro representativo de 5 ADN Polimerasas (Falta Familia D). Familia A: polimerasa I *T. aquaticus*. Familia B: polimerasa RB69. Familia C: polimerasa III *E. coli*. Familia X: polimerasa λ . Familia Y: polimerasa Dpo4 *S. solfataricus*. Todas las polimerasas tienen una forma conservada, que puede ser vista como una mano derecha, con los subdominios de dedos, palma y pulgar, mostrados de distintos tonos de azul. Subdominios adicionales coloreados en amarillo son específicos para cada familia: Exo, dominio exonucleasa 3' \rightarrow 5'. Nt, dominio N-terminal. PHP, dominio Polimerasa-Fosfatasa Histidinol. 8Kda, dominio de 8 Kilo daltons. LF, dominio de dedos pequeños (Tomado y modificado [1]).

1.4 Phi29 como modelo de estudio.

Se decidió usar a la ADN polimerasa del bacteriófago Phi29 como modelo de estudio para el presente trabajo debido a que es la enzima más estudiada de la subfamilia B2. La anterior es una ADN polimerasa de 66 KDa, dependiente de ADN, que emplea como iniciador una proteína terminal (TP), la cual se encuentra anclada a ambos extremos 5' del bacteriófago [8]. Tiene, además de la actividad de ADN polimerasa, una capacidad 3' → 5' exonucleasa [8, 9, 10]. Es altamente procesiva, puede sintetizar hasta 70,000 nucleótidos por cada evento de unión al ADN [8,9] y es capaz de realizar amplificación por desplazamiento de hebra [8, 9, 10], por lo que no requiere de ninguna helicasa para su funcionamiento [8].

1.5 Inserciones TPR1 y TPR2.

Como ya se mencionó, la inserción TPR1 se encuentra localizada entre los motivos del dominio de polimerización A y B, se extiende desde el residuo 261 al 358 de la ADN polimerasa de Phi29, lo cual le confiere plegado de α hélice y hoja β , y es capaz de interactuar tanto con el ADN como con la proteína terminal debido a dicha conformación. Se ha visto que es el residuo Asp332 de la inserción del TPR1 el que mantiene dicha interacción con la proteína terminal y el ADN. En promedio tiene 55 aminoácidos; y tiene 7 residuos conservados en polimerasas de esta familia, siendo uno básico: Lys305, uno ácido: Asp332, dos hidrofóbicos: Leu333 y Leu342, y tres aromáticos: Tyr315, Tyr340 y Phe353 [5, 11].

La inserción TPR2 de Phi29 consta aproximadamente de 25 aminoácidos localizados como ya se mencionó entre los motivos B y C del dominio de polimerización [5]. Para probar el papel que juega dicha inserción en su capacidad de desplazamiento de hebra y su alta procesividad, se construyó una mutante de la ADN polimerasa de Phi29 sin los residuos Asp398 hasta Glu420 y se encontró que la inserción juega efectivamente, un papel importante en las características mencionadas [12]. Junto con el subdominio del pulgar, el TPR2 forma un túnel mediante el cual la polimerasa forma un círculo alrededor del ADN,

mejorando así la procesividad de manera análoga a las proteínas de anclaje del ADN en el complejo de replicación [11].

A continuación, se muestra en la figura 4 la manera en que el dominio de exonucleasa y los subdominios de la palma, dedos, pulgar y TPR2 forman un camino en el cual parecen entrar los dNTP's y el pirofosfato sale del sitio activo; así como la manera en que la polimerasa atrapa al ADN entrante gracias a la ayuda del motivo TPR2.

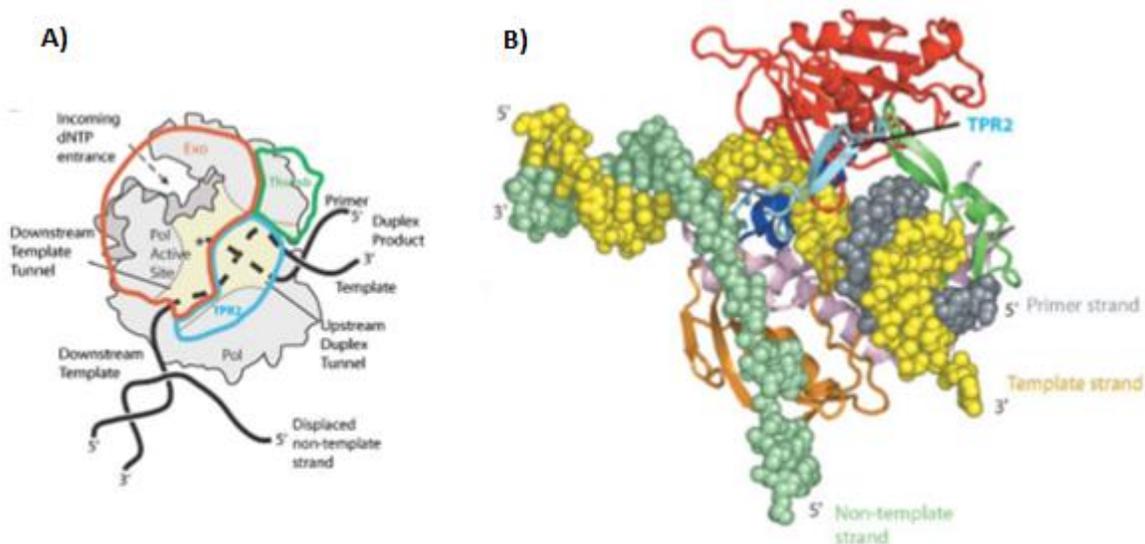


Figura 4. A) Representación esquemática de la polimerasa Phi29 con sustrato. La proteína se muestra en dos niveles: El nivel superior contiene el dominio de exonucleasa, el subdominio TPR2 y el subdominio del pulgar de rojo, azul y verde respectivamente. El resto de la proteína se muestra en gris. **B) Modelo detallado de la horquilla de replicación de la ADN polimerasa Phi29.** Basándose en la información obtenida de un modelo en 3-D, la inserción TPR2 de la ADN polimerasa de Phi29 contribuiría a un encirculado total del sustrato de ADN, confiriéndole una excelente procesividad, promoviendo la apertura de las hebras parentales del ADN, y el enhebrado subsecuente del templado en el sitio activo del túnel. De esta manera, la inserción TPR2 actúa como calce para acoplar la polimerización al desplazamiento de hebra. (A tomado de [11], B tomado de [12]).

1.6 EL PCR.

Es un método *in vitro* de síntesis de ácidos nucleicos por el cual un segmento particular de ADN puede ser específicamente replicado. Involucra dos “primers” de oligonucleótidos que flanquean el fragmento de ADN que será amplificado. Ciclos repetidos de desnaturalización por calor del ADN, el alineamiento de los primers a sus secuencias complementarias y la extensión de los primers alineados con una ADN polimerasa, representan la esencia de esta

técnica de amplificación de ADN. La especificidad y el rendimiento de la técnica dependen de dicha polimerasa. Durante los primeros años de existencia de la técnica, la polimerasa utilizada era el Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, proveniente de *Escherichia coli*, sin embargo, dicha enzima tuvo que ser reemplazada por la enzima Taq Polimerasa [13] debido a que se inactivaba cada vez que se necesitaba desnaturalizar el ADN y por consiguiente se debía agregar nueva polimerasa en cada paso. En consecuencia, La Taq polimerasa ha sido por años la enzima de elección para llevar a cabo millones de procesos de PCR. Dicha enzima es producida por la bacteria *Thermus aquaticus*, caracterizada por su estabilidad en altas temperaturas sin desnaturalizarse [13]; siendo 75° - 80°C, su temperatura óptima, con una vida media mayor a dos horas a 92.5 °C, 40 minutos a 95 °C, y 9 minutos a 97.5 °C. Es capaz de replicar una cadena de ADN de 1000 pares de bases en menos de 10 segundos a 72°C. Una de sus principales desventajas, es su baja fidelidad, además de que carece de actividad exonucleasa de 3' → 5' [14] y tiene un promedio de incorporación de 1 error por cada 9,000 nucleótidos [15].

2. AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA.

Existen métodos alternos al PCR para la amplificación de secuencias específicas de ADN. Generalmente, dichas alternativas no requieren de cambios de temperatura, por lo cual son conocidos como protocolos de amplificación isotérmica; y como una alternativa al PCR, ofrecen la clara ventaja de no requerir de un equipo termociclador, gracias a que la temperatura se mantiene constante a lo largo del proceso. Asimismo, el tiempo inherente al proceso es menor, tienen una alta producción y se obtienen resultados confiables y precisos [16]. La característica más importante que comparten los métodos de amplificación isotérmica, es que utilizan enzimas con la capacidad de efectuar amplificación por desplazamiento de hebra [17].

A continuación, se ilustran tres métodos distintos de amplificación isotérmica.

2.1 Métodos de amplificación isothermal: Amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP).

LAMP es un nuevo método de amplificación genética, que realiza síntesis de ADN por desplazamiento de hebra gracias a la habilidad del fragmento largo de la *Bst* ADN Polimerasa y un set de cuatro primers especializados: dos primers internos, designados Primer Interno de Avance (FIP) y Primer interno de Retroceso (BIP), los cuales se utilizan en todo el proceso de reacción de síntesis por desplazamiento de hebra; y dos primers externos, Primer de Avance (F3) y Primer de Retroceso (B3), los cuales se usan sólo en los pasos iniciales del LAMP. Estos cuatro primers reconocen seis secuencias distintas en el ADN blanco durante los primeros pasos del método [18].

Algunas de las ventajas del LAMP contra el PCR son: 1) LAMP no requiere del equipo termociclador, ya que todas las reacciones se efectúan a temperaturas entre 60°- 65 °C. 2) La amplificación es altamente selectiva, debido al requerimiento de los primers especializados. 3) El límite de detección de LAMP es igual o mayor al del PCR y el tiempo de detección es menor. 4) La reacción del LAMP se puede acelerar usando dos primers tipo

lazo especializados. 5) No se requiere la visualización de productos de ADN en electroforesis por gel para determinar si se ha logrado una amplificación exitosa, debido a que una reacción positiva de LAMP provoca que la solución se vuelva espesa, gracias a la formación del pirofosfato de magnesio como producto secundario, [19] facilitando con ello la confirmación del proceso.

El mecanismo de reacción de LAMP se muestra en la figura 5. El primer interno FIP se hibridiza a F2c en el ADN blanco, iniciando la síntesis de hebra complementaria. El primer externo F3, el cual es pocas bases más corto y menor concentrado que FIP, se hibridiza lentamente a F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra, liberando una hebra complementaria unida al FIP, la cual forma una estructura con un lazo en un extremo (estructura 4). Este ADN de cadena sencilla sirve como templado para la síntesis de ADN, iniciado por BIP y una subsecuente síntesis de ADN por desplazamiento de hebra por parte de B3, resultando en la producción de una estructura con forma de mancuerna, la cual se convierte rápidamente a una estructura de ADN tipo tallo-lazo mediante síntesis auto-primada de ADN (estructura 7). Este ADN tipo tallo-lazo sirve como el material inicial para el ciclado del LAMP; que es la segunda etapa de la reacción LAMP [18].

Para dar inicio al ciclado, FIP se hibridiza al lazo de la estructura de ADN tallo-lazo y da inicio a la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra, generando como producto intermedio un ADN tallo-lazo hueco con una copia adicional invertida de la secuencia blanco en el tallo y un lazo en el extremo contrario formado por la secuencia BIP (estructura 8). Una subsecuente síntesis de ADN por desplazamiento de hebra auto primada produce una estructura complementaria del ADN tallo-lazo original (estructura 10) y un ADN tallo-lazo sin huecos con el tallo elongado hasta el doble y un lazo en el extremo contrario (estructura 9). Ambos productos sirven como templado para una reacción de desplazamiento de hebra primado por BIP en los pasos siguientes: elongación y reciclaje. Así en el método LAMP la secuencia blanco se amplifica al triple cada medio ciclo [18].

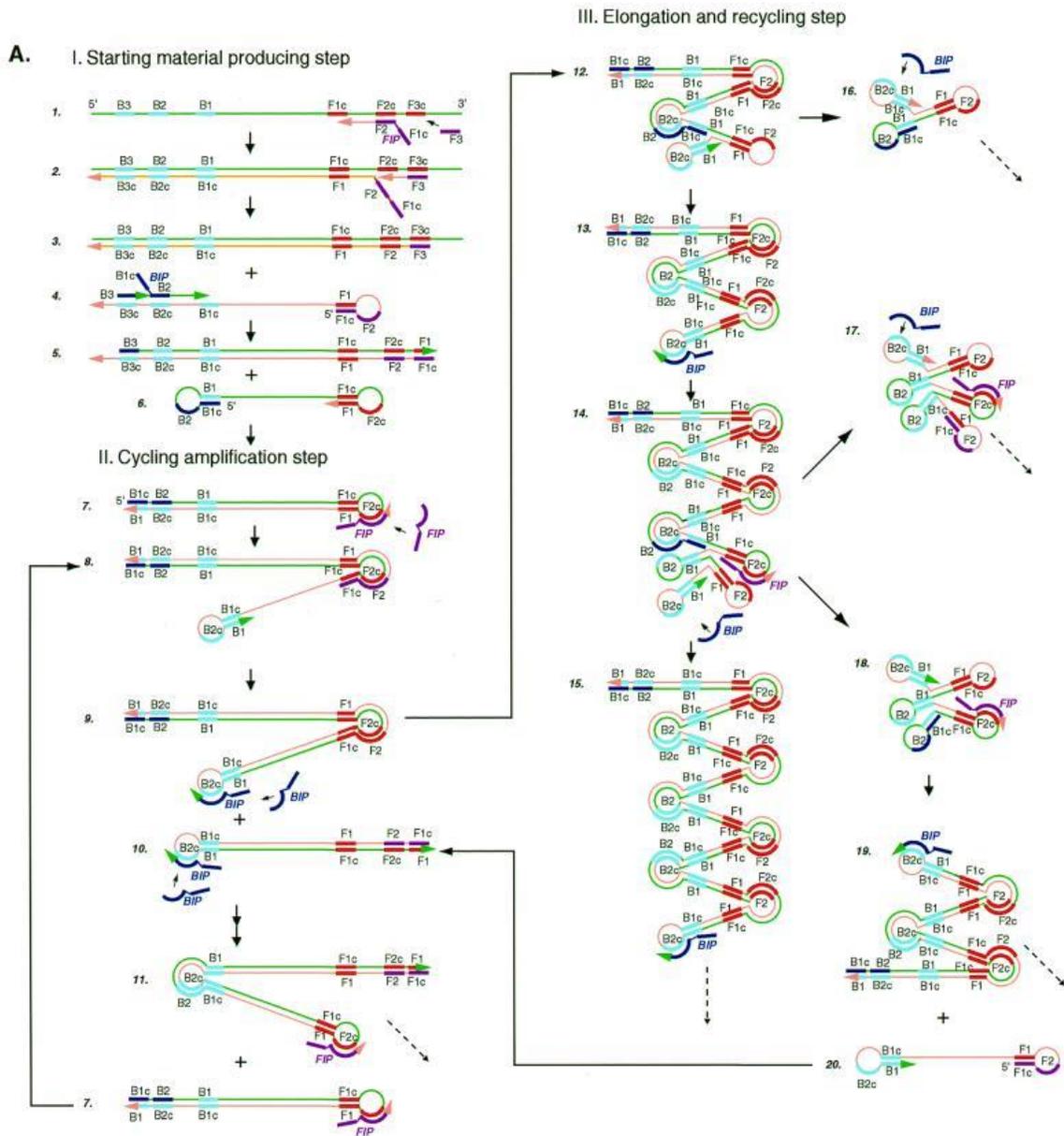


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de LAMP. Pasos involucrados en la reacción de LAMP. Está figura muestra el proceso que inicia desde el primer FIP. No obstante, se debe recordar que la síntesis de ADN podría iniciar desde el primer BIP, saltándose varios pasos. (Tomado de [18]).

El producto final es una mezcla de ADN tallo-lazo con diferentes longitudes de tallos y estructuras parecidas a coliflores con lazos múltiples formados por el alineamiento entre repeticiones alternadas invertidas de la secuencia blanco en la misma hebra (estructuras 16-18) [18].

2.2 Métodos de amplificación isothermal: Amplificación por círculo rodante (RCA).

RCA es un método vigente desde 1989, en el cual se pueden utilizar distintas ADN polimerasas y distintos templados circulares. Después del alineamiento de un primer específico a la molécula templado de hebra sencilla, la polimerasa incorpora nucleótidos en una dirección complementaria $5' \rightarrow 3'$ a la hebra templado. En caso de tener una molécula templado linear, la síntesis se completa al final del templado como se ilustra en la figura 6a. En caso de que el templado sea uno circular, la polimerasa llega una segunda vez al sitio de unión del primer, desplaza la hebra que acaba de ser sintetizada y continúa con la síntesis de ADN por varias rondas más, dependiendo de la longitud del templado como se muestra en la figura 6b. Gracias a este mecanismo, una molécula grande de ADN consistente de copias repetidas de la secuencia templado es producida, llevando a una amplificación más eficiente de un blanco circular comparado contra un blanco linear; esto es, utilizando un solo primer. Agregando un segundo primer con un sitio de unión en la hebra complementaria, se logrará una amplificación aún más eficiente dado que este primer se puede unir a la hebra desplazada y así iniciar una síntesis adicional de ADN; en este caso los productos son ADN de doble hebra. Para templados circulares, la amplificación multi-primada es más eficiente dado que los primers, con secuencias aleatorias, se unen a muchos sitios de la molécula templado tal y como se puede observar en la figura 6c [20].

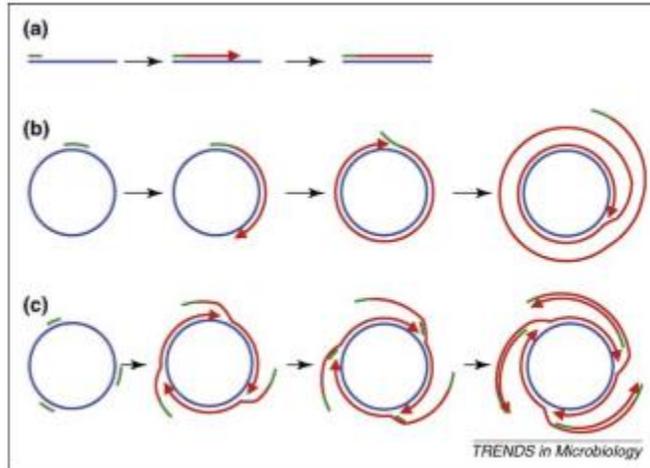


Figura 6. Principio de la amplificación por círculo rodante. Las líneas azules representan secuencias blanco de ADN, las verdes primers de oligonucleótidos, y las rojas ADN recién sintetizado por la polimerasa. Las flechas indican los extremos 3' de las hebras crecientes de ADN. (a) Templado lineal y primer sencillo. Después de la unión del primer la polimerasa sintetiza la hebra complementaria. (b) Templado circular y primer sencillo. La polimerasa sintetiza una hebra complementaria iniciando en el primer unido. Después de una ronda el primer y la hebra sintetizada son desplazados y la síntesis de ADN continúa por rondas adicionales. Por esta acción una hebra sencilla concatemérica de ADN es producida. (c) Templado circular y múltiples primers aleatorizados. La síntesis inicia en los primers múltiples unidos al templado. La síntesis por desplazamiento de ADN ocurre como en (b). Sin embargo, los primers aún presentes en la reacción se unen a la hebra desplazada y son usados como puntos adicionales de síntesis de ADN. Los productos son moléculas de doble hebra concatemérica de ADN (Tomado de [20]).

2.3 Métodos de amplificación isothermal: Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA).

MDA es un método para amplificar ADN mediante el uso de primers aleatorios y de la Polimerasa Phi29 proveniente del bacteriófago Phi29 de *Bacillus subtilis*. Se utiliza esta enzima debido a su alta procesividad (referente al número de nucleótidos que puede adicionar al extremo 3' terminal antes de disociarse del ADN) y a su fuerte actividad de desplazamiento de hebra. La polimerasa es capaz de adicionar en promedio 70,000 nucleótidos en cada evento de asociación al templado. Estas características le permiten a la polimerasa copiar el mismo templado muchas veces, extendiendo nuevos primers al mismo tiempo que desplaza los productos previamente extendidos. La amplificación exponencial provoca un intermediario estructural del ADN con forma de varias ramas como se muestra en la figura 7 [21].

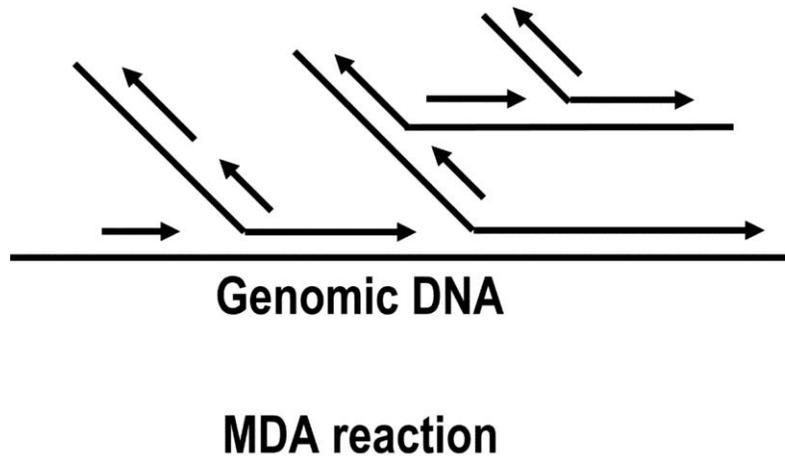


Figura 7. La reacción del MDA. El templado de ADN es copiado por un mecanismo de ramificación en el que la ADN polimerasa Phi29 extiende los primers hexaméricos aleatorios mientras que la fuerte actividad de desplazamiento de hebra desplaza al mismo tiempo las copias previamente hechas (Tomado de [21]).

Otra característica de la reacción del MDA es la presencia de primers aleatorios protegidos por uniones fosforotioato en los dos nucleótidos 3' terminales, así como se muestra en la figura 8; esto es necesario para prevenir la degradación de los primers debido a la actividad exonucleasa 3' → 5' de la polimerasa, la cual confiere la ventaja de que hay pocas mutaciones acumuladas durante el MDA. Durante la amplificación por MDA se pierde un poco de material genético, sin embargo, el 99.8% del genoma permanece intacto. Así mismo, el MDA tiene el menor rango de error reportado hasta el día de hoy [21].

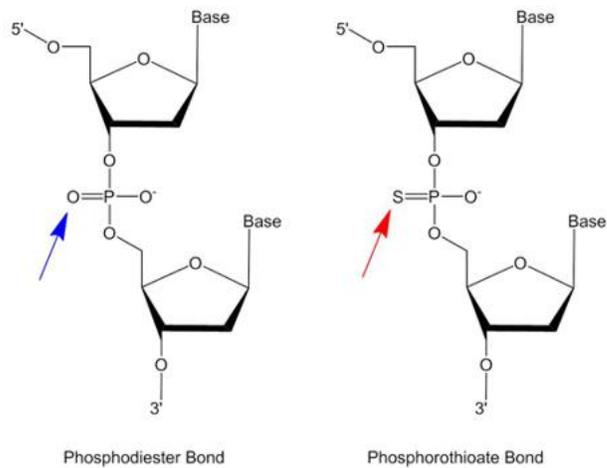


Figura 8. Enlaces internucleotídicos fosfodiéster y fosforotioato. Las fracciones de azúcar en los oligonucleótidos de ADN en estado nativo están unidas mediante fosfato (tiene un oxígeno no-punteante, flecha azul), mientras que las fracciones de azúcar en los oligonucleótidos con reactivo de sulfuración están unidos por fosforotioato (tiene un azufre no-punteante, flecha roja) [22].

3. LAS 5 PROTEÍNAS ESTUDIADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.

A continuación, se presentan las cinco enzimas ADN polimerasas que se seleccionaron para ser estudiadas, se proporcionan datos de en dónde fueron encontradas geográficamente, las temperaturas a las cuales se encontraron y datos bioquímicos de cada una de ellas. La razón por la cual se seleccionaron estas cinco ADN polimerasas, es porque se piensa que tienen la capacidad de realizar desplazamiento de hebra debido a la presencia del motivo TPR2 en sus estructuras.

3.1 *Exiguobacterium antarcticum*.

Es una bacteria psicrotrófica, es decir, tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes extremadamente fríos desde -12° hasta 55°C ; se aisló por primera vez de esteras microbianas del lago Fryxell en la Antártida. Es una bacteria gram positiva, con la capacidad de movimiento gracias a que tiene flagelos distribuidos de manera uniforme en toda su superficie, no tiene la capacidad de formar esporas y presenta un color naranja brillante [23]. Esta conformada por 727 amino ácidos, 2,195 pares de bases, pesa 84,775.31 Daltons, tiene un pI de 5.41, su coeficiente de extinción molar es de $112,540\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y su motivo TRP2 consta de 42 amino ácidos.

3.2 *MSBL1 Archaeon*.

Es una archaea que fue aislada de lagos salados del Mediterráneo, y se cree que es un organismo autótrofo capaz de fermentar azúcares. Es capaz de sobrevivir a ambientes hiper-salinos debido a su habilidad de importar o sintetizar osmolitos, lo que le permite mantener su balance intracelular osmótico. Se encontró a una profundidad de 2,141 metros, a una temperatura de 44.8°C , a una salinidad de 26.2% y a un pH de 6.2 unidades [24]. Esta conformada por 645 amino ácidos, 1,947 pares de bases, pesa 75,176.74 Daltons, tiene un pI de 7.2, su coeficiente de extinción molar es de $116,090\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y su motivo TRP2 consta de 30 amino ácidos.

3.3 *Methanocella arvoryzae*.

Es una archaea aislada de suelo de un campo de arroz en Italia. Es una bacteria metanogénica, es decir obtiene su energía a partir del metano. Durante su etapa temprana, sus células tienen forma de bastones, mientras que en su fase exponencial presenta forma de cocos. Puede crecer a una temperatura desde 37° hasta 55°C, aunque su crecimiento óptimo ocurre a los 45°C, con un rango de pH desde 6-7.8, aunque el óptimo es 7.0 y, puede crecer en presencia de sal desde 0-20gNaCl/L [25]. Esta conformada por 931 amino ácidos, 2,805 pares de bases, pesa 107,576.24 Daltons, tiene un pI de 8.05, su coeficiente de extinción molar es de 130,990 M⁻¹cm⁻¹ y su motivo TRP2 consta de 28 amino ácidos.

3.4 *Nitrosopumilus sp.*

Es una archaea capaz de oxidar amonio, se aisló de Svalbard, Noruega, cerca del círculo ártico. A diferencia de todas las arqueas capaces de oxidar el amonio obtenidas de ambientes marinos, *Nitrosopumilus* tiene la capacidad de utilizar la urea [26]. Esta conformada por 594 amino ácidos, 1,795 pares de bases, pesa 69,308.56 Daltons, tiene un pI de 9.65, su coeficiente de extinción molar es de 103,140 M⁻¹cm⁻¹ y su motivo TRP2 consta de 5 amino ácidos.

3.5 *Thermotoga sp.*

Es una bacteria que fue aislada del reservorio de hidrocarburos en Gippsland Basin, Australia, a 1,960 metros de profundidad, a una temperatura de 102°C, un pH de 7.2 con un 2.68% de sales. Tiene tolerancia a bajos niveles de oxígeno y cuenta con la enzima NAD(P)H oxido-reductasa [27]. Esta conformada por 715 amino ácidos, 2,157 pares de bases, pesa 85,173.67 Daltons, tiene un pI de 8.80, su coeficiente de extinción es de 167,540 M⁻¹cm⁻¹ y su motivo TRP2 consta de 43 amino ácidos.

4. HIPÓTESIS:

“La extensión del motivo TPR2 dictará la capacidad de desplazamiento de hebra de cada una de las cinco enzimas presentes en el estudio; a mayor longitud del motivo, mejor desplazamiento de hebra tendrán. “

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general:

“Evaluar la capacidad efectuar una amplificación por desplazamiento de hebra de las cinco ADN polimerasas”

5.2. Ojetivos específicos:

- 1) Modelar a las 5 enzimas ADN polimerasas y su interacción con un substrato de ADN.
- 2) Sub-clonar las 5 enzimas ADN polimerasas en pET19.
- 3) Realizar ensayos de expresión y purificación.
- 4) Realizar ensayos de polimerización.
- 5) Realizar ensayos de amplificación por desplazamiento de hebra.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Los cinco genes requeridos para la presente investigación, se mandaron hacer a la compañía Biomatik (www.biomatik.com), localizada en Ontario, Canadá. Los genes venían liofilizados y expresados en el vector pUC57 con sitios de corte para las enzimas BamHI y NdeI; se resuspendieron en 30 µl de buffer TAE (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 8.0) de la compañía QUIAGEN. Las concentraciones finales de los cinco genes quedaron en 166ng/µl.

En la figura 9 se explica el proceso seguido durante este trabajo de una manera esquemática para su mejor comprensión, con los puntos más importantes de cada experimento realizado.

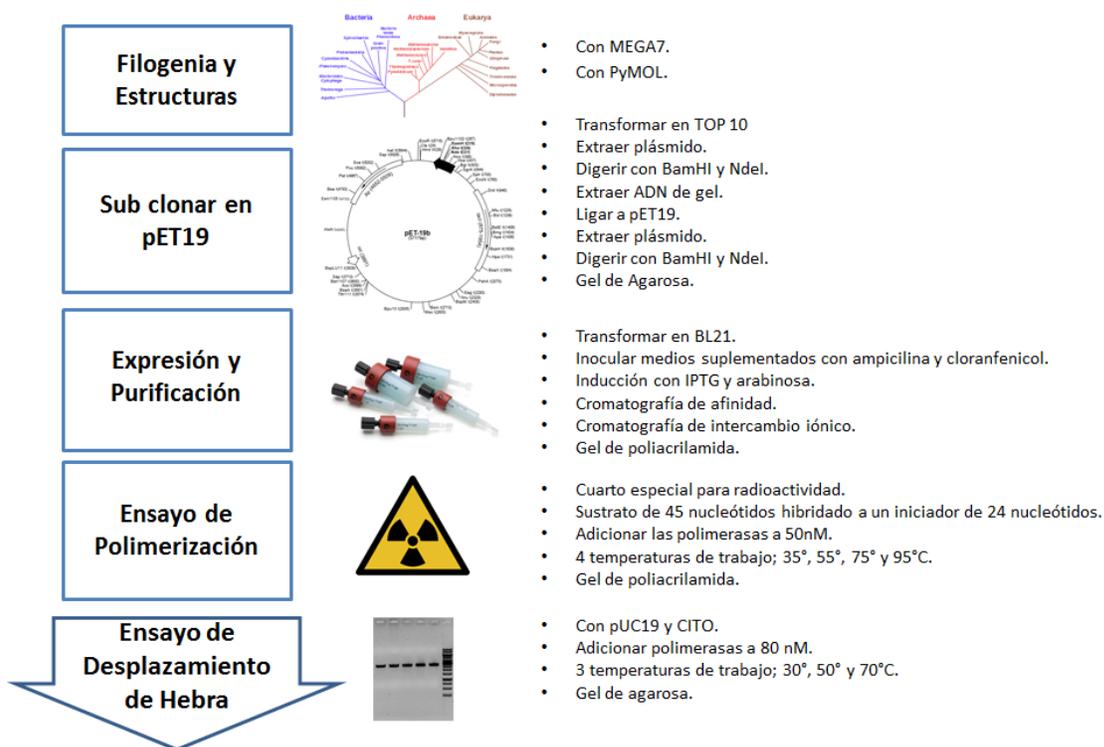


Figura 9. Esquema general del procedimiento efectuado en el presente trabajo. En el esquema se muestran los objetivos específicos en los que se decidió abordar el trabajo, (Filogenia y Estructuras, Sub clonado en pET19, Expresión y Purificación, Ensayo de Polimerización y Ensayo de Desplazamiento de Hebra), así como los puntos importantes de cada uno de ellos.

Se explica a continuación de una manera detallada cómo se efectuaron los experimentos para poder cumplir con cada uno de los objetivos.

6.1 Análisis filogenético y modelos estructurales de las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp*.

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de ADN polimerasas de la familia B2 en bases de datos, se tomó como base a la ADN polimerasa del bacteriófago Phi29. Se obtuvieron las secuencias y se redujo la lista a sólo 22 secuencias de la familia B2. En el siguiente paso se efectuó su alineamiento con Clustalw [28]. Se obtuvo el alineamiento, y se tomaron solamente los 22 dominios de polimerización de las polimerasas, incluyendo el motivo TPR2 de cada una de ellas. La construcción filogenética de las secuencias de los motivos de polimerización se obtuvo utilizando el método de máxima verosimilitud con rtREV + G + F como modelo de sustitución, con un valor de gamma igual a 0.4617 y 300 repeticiones en el programa MEGA7.

Los modelos por homología de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp.*, se construyeron utilizando el programa PyMOL iZ3D (Dynamic Clone), usando como templado la estructura cristalográfica del complejo ADN polimerasa de Phi29 y su sustrato de ADN PDB:1XHX_A.

6.2 Sub-clonado de los genes en pET19.

Se transformaron los genes de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp* en células competentes Top 10 de *E. coli*.

Para esto, se agregó 1 µl de cada uno de los 5 genes a 100 µl de células competentes Top 10; se dejó reposar la mezcla por 30 minutos en hielo y después se aplicó un shock térmico de 42°C por 45 segundos en un baño maría (Blue M Mega Whirl de Electric Company), seguido de un nuevo ciclo en hielo por 2 minutos. Se agregaron 300 µl de medio LB (10g/L Triptona, 5g/L extracto de levadura, 5g/L NaCl) y se depositó la mezcla en una incubadora (Orbital shaker incubator de la compañía MRC) a 37°C, con una agitación de 200 RPM's por

1 hora. Al paso de dicha hora, se plaqueó cada mezcla en una caja Petri independiente con medio LB y ampicilina y se dejaron reposar entre 12 y 18 horas a una temperatura de 37°C.

Al paso de las 12-18 horas a 37°C, se retiraron las 5 cajas Petri con colonias de cada uno de los cinco genes de esa temperatura y se trasladaron a un cuarto a temperatura ambiente, se depositaron en una campana de extracción (NuAire), donde a cinco tubos de ensayo de vidrio previamente esterilizados se les agregó 5 ml de medio LB, 5 µl de ampicilina y con la ayuda de una punta de micropipeta se adicionó una colonia a cada tubo, de esta manera se tuvo un pre-inóculo de cada gen; se depositaron los 5 tubos de ensayo a 37°C a 200RPM por 16 horas.

Después de las 16 horas se procedió a efectuar la extracción de plásmido (GeneJET Plasmid Miniprep Kit Thermo Scientific) de cada uno de los cinco genes, siguiendo la metodología que a continuación se presenta: 1) Se centrifugó (Mini centrifuga Eppendorf Centrifuge 5424) en un tubo eppendorf distinto para cada gen el volumen contenido en su respectivo tubo de ensayo por 5 minutos a 13,000 RPM's. 2) Se resuspendió la pastilla obtenida del paso anterior en 250 µl de solución de resuspensión, la resuspensión se efectuó por vórtex. 3) Se agregaron 250 µl de solución de lisis y se mezcló invirtiendo el tubo alrededor de seis veces hasta que la solución se tornó levemente clara. 4) Se agregaron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo alrededor de seis veces. 5) Se centrifugó por 5 minutos a 13,000 RPM's y se formó una pastilla de ADN cromosomal y desperdicios celulares. 6) Se transfirió el sobrenadante a una columna GeneJET mediante decantación y se evitó transferir el precipitado blanco. 7) Se centrifugó por 1 minuto a 13,000 RPM's y se eliminó el sobrenadante, se colocó la columna de vuelta en el mismo tubo de colecta. 8) Se agregaron 500 µl de solución de lavado a la columna GeneJET y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 RPM's y se eliminó el sobrenadante, se colocó la columna de vuelta al mismo tubo de colecta. 9) Se repitió el procedimiento de lavado anterior. 10) Se eliminó el sobrenadante y se centrifugó por 1 minuto adicional a 13,000 RPM's, así se removió la solución de lavado residual, (paso esencial para evitar la acumulación de etanol residual). 11) Se transfirió la columna GeneJET a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 50 µl de buffer de elución al centro de la membrana de la columna GeneJET y se

eluyó el ADN plasmídico, sin hacer contacto con la membrana. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 5 minutos a 13,000 RPM's. 12) Se eliminó la columna y se almacenó el plásmido purificado a -20°C.

Después de haber purificado el plásmido de cada uno de los 5 genes se digirieron los genes con las enzimas BamHI y NdeI por 4 horas a una temperatura de 37°C, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Componentes de la digestión de los 5 genes para 15 µl de reacción.

Componente	Exiguobacterium	MSLB1 Archeon	Methanocella	<i>Nitrosopumilus</i>	Thermotoga
Buffer 3.1	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
NdeI	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl
BamHI	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl
Agua	9.4 µl	9.1 µl	10.07 µl	9.77 µl	9 µl
Plásmido	3.5 µl	3.8 µl	2.83 µl	3.13 µl	3.9 µl

Después de haber llevado a cabo la digestión, se corrió un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, de esta manera se comprobó que la digestión hubiese liberado de manera exitosa los 5 fragmentos deseados, se cortó la banda del gel en donde estuvieran localizados los 5 genes, de acuerdo a su tamaño, y se extrajo el ADN con la ayuda del QIAquick PCR Purification kit de la compañía QIAGEN; se siguieron los pasos que a continuación se muestran: 1) Se agregaron 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen de la reacción del PCR y se mezcló; si el color de la mezcla resultaba naranja o violeta, se debía agregar 10 µl de acetato de sodio 3 Molar pH 5.0 y mezclar para que la mezcla se tornara amarillo, pero desde el principio tuvo esa coloración, por lo que no se agregó nada. 2) Se depositó una columna QIAquick en un tubo de colecta de 2 mililitros. 3) Se enlazó el ADN, alimentando la muestra a la columna QIAquick y se centrifugó por 30-60 segundos, se eliminó el sobrenadante y se colocó la columna QIAquick en el mismo tubo. 4) Se lavó agregando 750 µl de buffer PE a la columna QIAquick y se centrifugó por 30-60 segundos, se eliminó el sobrenadante y se colocó la columna QIAquick en el mismo tubo. 5) Se centrifugó la

columna QIAquick en el tubo de colección por un minuto y se eliminó el buffer de lavado residual. 6) Se colocó cada columna QIAquick en un nuevo tubo para micro-centrifuga de 1.5 mililitros. 7) Posteriormente, se eluyó el ADN agregando 50 µl de buffer EB o agua al centro de la membrana QIAquick y se centrifugó la columna por 1 minuto. Para una mayor concentración de ADN, se agregaron 30 µl de buffer de elución al centro de la membrana QIAquick, se dejó reposar la columna por 1 minuto y después se centrifugó.

Una vez que se extrajo el ADN de cada uno de los 5 genes de interés se continuó al siguiente paso; la ligación de los 5 fragmentos al vector final, es decir a pET19. El tiempo de ligación fue de 4 horas a una temperatura de 16°C y se emplearon los siguientes reactivos:

Tabla 2. Componentes de la ligación de los 5 genes a pET19, para 15 µl de reacción.

Componente	Exiguobacterium	MSLB1 Archeon	Methanocella	Nitrosopumilus	Thermotoga
Ligasa	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Vector (pET19)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
Buffer	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Agua	8.78 µl	6.81 µl	8.05 µl	6.25 µl	8.28 µl
Plásmido	1.22 µl	3.19 µl	1.95 µl	3.75 µl	1.72 µl

Se obtuvieron las ligaciones de los 5 genes en el vector pET19 y se procedió a purificar el plásmido como ya se explicó anteriormente en el presente trabajo (ver página 29-30, sección 6.2), se purificó el plásmido y se digirió con las enzimas BamHI y NdeI, y se agregaron los 5 cortes a un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio, con esto se comprobó la liberación de los fragmentos deseados. Una vez que se comprobó que dichos fragmentos tenían el peso molecular correcto, se mandaron a secuenciar los genes en pET19 a las instalaciones de secuenciación genómica del LANGEBIO.

Se analizaron los resultados de la secuenciación y se comprobó que efectivamente se tenían los genes correctos y se procedió al siguiente paso, el inicio de la purificación.

6.3 Expresión y Purificación de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp.* y *Thermotoga sp.*

El primer paso que se dio fue el de transformar los cinco genes con células de *E. coli* BL21 como ya se explicó anteriormente, una vez transformados los cinco genes con esta cepa, se plaquearon en 5 cajas Petri distintas con LB, ampicilina y cloranfenicol, se dejaron las cajas Petri por 16 horas en un cuarto a 37°C con la finalidad de obtener colonias. Posteriormente, se extrajeron las cajas de ese ambiente, y se mantuvieron en un cuarto a temperatura ambiente, dentro de una campana de seguridad. Se prepararon 5 matraces de 500 mililitros con 100 ml de LB, 100 µg/ml de ampicilina y 35 µg/ml de cloranfenicol y se procedió a extraer una colonia de cada caja Petri con la ayuda de una punta de pipeta, se depositó la punta con la respectiva colonia a cada uno de los 5 matraces y se dejaron en incubación por 16 horas a 37°C con una agitación de 200 RPM's. Al término de las 16 horas, se utilizaron los 5 matraces con sus respectivos genes para inocular 3 litros de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y 35 µg/ml de cloranfenicol y 0.2 g/L de Arabinosa. Los cultivos fueron crecidos hasta obtener una densidad óptica a 600 nm mayor o igual a 0.6, el monitoreo de las respectivas densidades ópticas se realizó con ayuda de un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800. Una vez alcanzada la densidad óptica requerida, se depositaron los matraces en hielo por 30 minutos y se les adicionó IPTG a una concentración 0.5 Molar. Se depositaron los matraces en una incubadora de New Brunswick Scientific Innova 40 a 16°C por 16 horas a una agitación de 200 RPM's. Al término del periodo de inducción, el cultivo se centrifugó a 4,000 RPM's por 15 minutos a una temperatura de 4°C en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-E Centrifuge. El sobrenadante fue desechado y las células fueron resuspendidas en 40 mililitros de un buffer de lisis que contenía: 500 mM de NaCl, 25 mM de Hepes pH 7.4, 10% de glicerol y 1mg/ml de lisozima para dar inicio a la lisis celular, y se incubó en hielo por 30 minutos. Al paso de los 30 minutos, se congeló con nitrógeno líquido y se dejó descongelar a temperatura ambiente por duplicado. Se sonicó la mezcla de entre 10 a 20 veces según su viscosidad, se agregó PMSF a 1 mM a la mezcla, a continuación, se llevaron las muestras al cuarto frío, se pusieron en agitación por 30 minutos mientras que se les agregó PEI pH 7.4 por goteo hasta que la mezcla cambió de color. Se procedió a

centrifugar las muestras a 13,000 RPM's por 1 hora a 4°C. Se colectó la fracción soluble y se filtró con jeringas y filtros de Merck Millipore de 0.45 µm y el filtrado se empleó para la purificación de las 5 proteínas.

Para el **primer paso de la purificación**, cromatografía de afinidad a metal (Níquel), se utilizaron 5 diferentes columnas de sefarosa-níquel de 1mlilitro de GE Healthcare, las cuales fueron previamente equilibradas con el buffer de lisis celular y 5 mM de Imidazol. Se prosiguió a pasar la fracción soluble filtrada por la columna, se realizaron dos lavados con soluciones similares a la de lisis. Al primer lavado se le adicionó 25 mM de Imidazol y al segundo lavado se le adicionó 50 mM de imidazol; la elución de las proteínas se efectuó con un buffer que contenía: 300 mM de NaCl, 25 mM de Hepes pH 7.4, 10% glicerol, 500 mM de Imidazol y 1 mM de PMSF. La elución fue dializada en un buffer que contenía: 50 mM de NaCl, 25 mM de Hepes pH 7.4, 10% glicerol, 1 mM de PMSF, 2 mM de EDTA y 5 mM de DTT.

Para el **segundo paso de la purificación**, cromatografía de intercambio iónico, se emplearon 5 columnas diferentes de Heparina de GE Healthcare y se les alimentó la elución del primer paso, y se fue eluyendo mediante un gradiente salino desde 50 mM hasta 2000 mM de NaCl. Las fracciones en que eluyeron las proteínas fueron colectadas y dializadas en un buffer que contenía: 100 mM de NaCl, 25 mM de Hepes pH 7.4, 50% glicerol, 1 mM de PMSF, 2 mM de EDTA y 5 mM de DTT. Se almacenaron las muestras dializadas a -20°C. Se verificó la pureza de la proteína y se evaluó mediante electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida-SDS y teñido con Azul Coomassie.

6.4 Ensayo de polimerización.

El sustrato utilizado para el ensayo de polimerización fue un oligonucleótido templado de 45 nucleótidos hibridado a un iniciador de 24 nucleótidos. Para llevar a cabo las distintas reacciones, se empleó un stock de buffer 10X que contenía 200 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM DTT 200 mM KCl, 5 mg/ml BSA y 100 mM MgCl₂, el cual fue diluido 1:10 veces usando 80 µl de buffer 10X y 720 µl de agua Mili Q.

Las polimerasas provenientes de *Exiguobacterium antarcticum* y *Thermotoga sp.* se diluyeron 1:20 veces con el buffer 1X para obtener una concentración final de 50 nM de polimerasa en la mezcla final. De manera similar, la polimerasa de *Methanocella arvoryzae* también fue diluida, pero 1:100 veces con el buffer 1X para obtener una concentración final de 50 nM de polimerasa en la mezcla final. Se emplearon las polimerasas Taq y Phi29 a manera de control para el experimento, dichas polimerasas fueron diluidas 1:100 veces con el mismo buffer 1X que fue empleado para diluir a las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *Thermotoga sp* y *Methanocella arvoryzae*.

Lo que se quería probar era a que temperaturas podían efectuar polimerización las enzimas polimerasas objeto de este estudio, por lo que se escogieron 35°, 55°, 75° y 95° C como prueba, por lo que se prepararon 4 réplicas de cada polimerasa, dando un total de 20 reacciones distintas. En los 20 casos la mezcla buffer 1X-polimerasa se llevó hasta los 7.75 µl, para luego ser depositadas en 4 distintos termo-cicladores de la marca Bio-Rad (C1000 touch thermal cycler), programados a 35°, 55°, 75° y 95° respectivamente, cada termo-ciclador contenía las cinco diferentes polimerasas objetos de estudio, es decir cada equipo tenía a las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *Thermotoga sp*, *Methanocella arvoryzae* Taq y Phi29. El tiempo de incubación para cada una de las 4 diferentes temperaturas fue de 10 minutos. Una vez pasados los 10 minutos, se adicionaron a cada una de las 20 reacciones 1.25 µl de dNTP's y 1 µl de ADN previamente marcado con γ -P32 ATP, de modo que en cada reacción habían 10 µl exactos. Justo después de dicha adición, se pusieron las 20 mezclas en una incubadora Amersham Biosciences a una temperatura de 37° C por otros 10 minutos. Al paso de ese tiempo, se agregaron 10 µl de buffer de paro para detener la reacción, se procedió a depositar las 20 mezclas en un termoblock a 95° C por 5 minutos, para luego depositarlas en hielo por otros 5 minutos. Una vez enfriadas las reacciones, se centrifugaron rápidamente en una mini centrifuga MiniSpin Eppendorf para que todo el líquido que estuviera en las paredes se fuera al fondo del tubo. Finalmente las 20 reacciones se resolvieron en un gel al 16% de poliacrilamida y 8 M de urea. En todo momento la radioactividad fue monitoreada con un equipo Geiger de Thermo Electron Corporation Survey Meter.

Se analizó el gel con un equipo Storm 840 PhosphorImager y con el software Quantity one de Biorad.

6.5 Ensayo de amplificación por desplazamiento de hebra.

Para llevar a cabo el ensayo de amplificación por desplazamiento de hebra, se tomaron como guía los protocolos de Shoib et al. y de De Vega et al. [29 y 10]. En primer lugar, se preparó 1 mililitro de un buffer 10X con los siguientes componentes: 370 mM de Tris-HCl, 100 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 50 mM (NH₄)SO₄, 2% de Tween 20 y Agua. Una vez preparado dicho buffer, se procedió a hacer dos extracciones de plásmido por el método Mini Prep, (previamente explicado), a pUC19 y a CITO con la finalidad de comprobar que hubiera una amplificación con dos fuentes distintas de ADN. Una vez obtenidos los plásmidos correspondientes de pUC19 y de CITO, se efectuaron las siguientes mezclas.

Tabla 3. Componentes de las Reacciones de amplificación por desplazamiento de hebra Para 10 µl de reacción.

Componente	pUC19 1X	pUC19 10X	CITO 1X	CITO 10X
H ₂ O	2.5 µl	25 µl	2.5 µl	25 µl
Buffer Rxn 10X	1 µl	10 µl	1 µl	10 µl
BSA	1 µl	10 µl	1 µl	10 µl
DTT	0.5 µl	5 µl	0.5 µl	5 µl
ADN	1 µl	10 µl	1 µl	10 µl
Primer Aleatorizado Resistente a Exonucleasas	1 µl	10 µl	1 µl	10 µl
DNTP's	2 µl	20 µl	2 µl	20 µl

La concentración final del DTT fue de 2 mM, la del BSA fue de 10 µg/µl, de los DNTP's fue de 2 mM y de los Primers aleatorizados resistentes a exonucleasas fue de 50 µM. Una vez

teniendo las 10 reacciones tanto de pUC19 como de CITO con todos los componentes necesarios para una reacción de desplazamiento de hebra, excepto por las polimerasas, se procedió a la programación de 3 distintos termo-cicladores de la marca Bio-Rad (C1000 touch thermal cycler), esto por que para cada polimerasa de *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y Phi29, se probaron tres diferentes temperaturas; 30°, 50° y 70° C. Además, como ya se mencionó, las enzimas no se agregaron desde el principio a las mezclas, sino en un paso intermedio del PCR isoterma.

El proceso que se siguió fue el siguiente; una vez programados los tres termo-cicladores, se alimentaron 9 µl a 18 tubos de PCR y se depositaron 3 tubos con pUC19 y 3 tubos con CITO en el termo-ciclador 1 a 30°C, 3 tubos con pUC19 y 3 tubos con CITO en el termo-ciclador 2 a 50°C y 3 tubos con pUC19 y 3 tubos con CITO en el termo-ciclador 3 de 70°C; después, se dejaron los 18 tubos a 95°C por tres minutos, inmediatamente después se enfriaron por 5 minutos a 4°C, mientras transcurrían esos 10 minutos, se iba pausando el programa de cada termo-ciclador justamente al paso de 5 minutos y se adicionaba 1µ de las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y Phi29 a una concentración de 80nM en cada uno de los tubos, de manera que en el termo-ciclador 1, 2 y 3 habían dos tubos de *Exiguobacterium antarcticum*, dos tubos de *Methanocella arvoryzae* y dos tubos de Phi29; justo después de terminar de agregar las polimerasas a los seis tubos de cada termo-ciclador, se reanudaba el programa y se cumplían los mencionados 10 minutos a 4°C. Después de haber efectuado el mismo proceso para los 3 distintos termo-cicladores, se procedió dejando por 4 horas a las respectivas temperaturas de amplificación 30°, 50° y 70°C. Al paso de las 4 horas, se prosiguió a dejar por 10 minutos a 80°C los todos los tubos para detener las reacciones, después se colocaron a 4°C por dos minutos, se digirieron las 18 reacciones con la enzima HindIII y se corrió finalmente un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, el cual se analizó con un foto-documentador Biorad para comprobar si había o no ocurrido una amplificación por desplazamiento de hebra.

7. RESULTADOS.

Se muestran a continuación los resultados de las simulaciones por computadora del árbol filogenético en el programa MEGA7, las estructuras teóricas de las 5 proteínas en base a Phi29 efectuadas con el programa PyMOL, así como los diversos geles de los experimentos de clonación, expresión y purificación, polimerización y desplazamiento de hebra.

7.1 Análisis filogenético y modelos estructurales de las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp*.

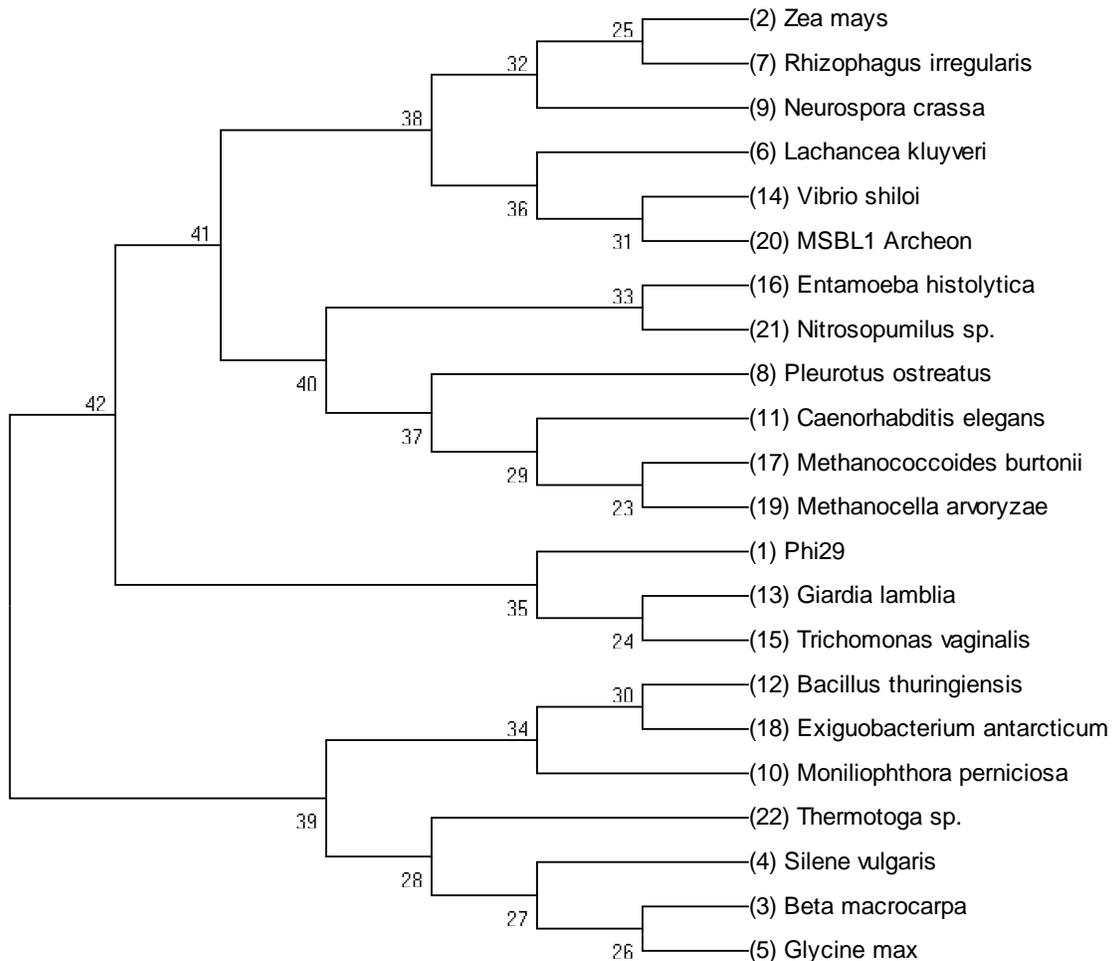


Figura 10. Árbol filogenético de diversos integrantes de la Familia B2. La construcción filogenética de las secuencias de ADN polimerasas se obtuvo utilizando el método de máxima verosimilitud y un bootstrap de 300 repeticiones con el programa MEGA7.

Al analizar las secuencias de la ADN Polimerasa de Phi29 y las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp.* de una manera más detallada, se notó que las cinco polimerasas referentes a este estudio, comparten similitudes con la Polimerasa de Phi29. Las seis polimerasas tienen su dominio de polimerización conservado en sus tres motivos (A, B y C) [30], a excepción de un pequeño fragmento denominado 2b cuya secuencia es *TxxGR*, el cual sólo está presente en la polimerasa de Phi29, se cree que los aminoácidos Thr434 y Arg438 de dicho motivo están involucrados en la unión de la polimerasa de Phi29 al primer [31]. Las seis polimerasas comparten el motivo *YxGG/A* (CT), el cual cumple una labor de separador de los dominios de polimerización y de 3'→5' exonucleasa, coordina además entre síntesis y degradación de la polimerasa, este motivo se encuentra en la región conectora de los dominios N y C terminales [32]. Otro motivo conservado en las seis polimerasas es *KxY*, el cual forma parte del sitio activo de la polimerasa y es al parecer responsable de estabilizar la parte terminal del primer [31]. La ADN Polimerasa de Phi29 tiene actividad exonucleasa 3'→5', cuenta con los tres segmentos altamente conservados entre polimerasas con dicha capacidad, denominados EXO I, EXO II y EXO III [30]. De las 5 polimerasas referentes a este estudio, se encontró que únicamente *Thermotoga sp.* cuenta con una actividad 3'→5' exonucleasa, es importante mencionar que solamente *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.* fueron analizadas en base a si tienen o no actividad 3'→5' exonucleasa; más adelante en la sección 7.4 del presente escrito, se detalla más.

Se muestra en la figura 11 una representación modular de las seis polimerasas sin los dominios de exonucleasa.

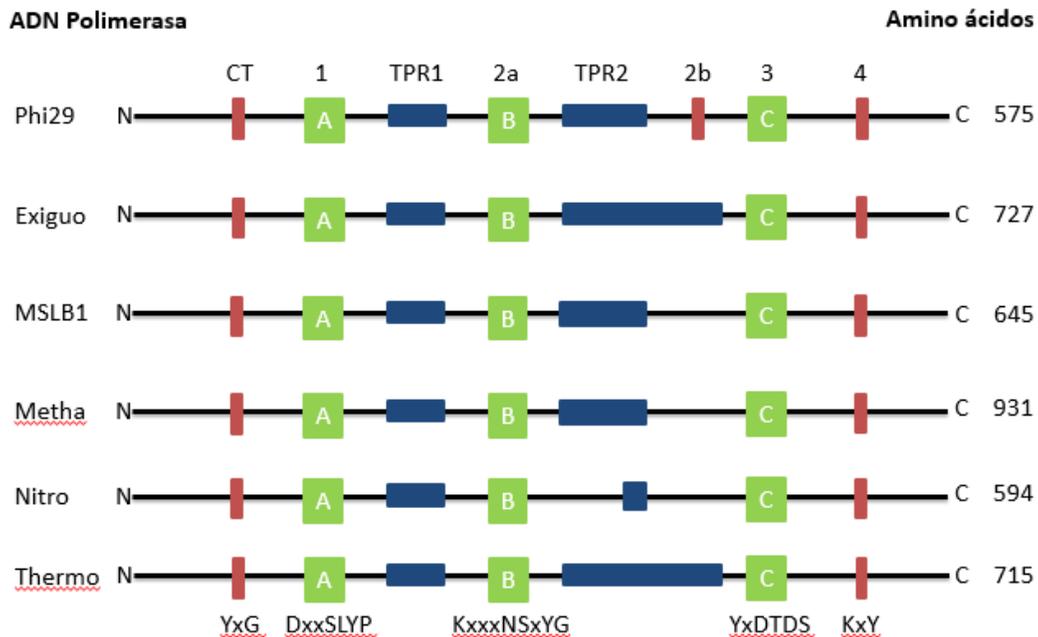


Figura 11. Representación modular de las polimerasas de Phi29, *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp*. En ninguno de los seis casos se muestra el dominio de exonucleasa, de azul se pueden ver los motivos TPR1 y TPR2, de verde los tres motivos de polimerización A, B y C, de rojo los motivos *YxG*, *KxY* y *TxxGR*, el último exclusivo de Phi29.

Como ya se mencionó, para la realización de los 5 modelos estructurales de las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp* y *Thermotoga sp.*, se utilizó el programa PyMOL, en el que se alineó cada una de las 5 polimerasas generadas con Swiss Protein contra la Polimerasa de Phi29 y su sustrato de ADN. En la figura 12, se muestran las estructuras obtenidas de dicha simulación, así como el modelo estructural de la Polimerasa Phi29.

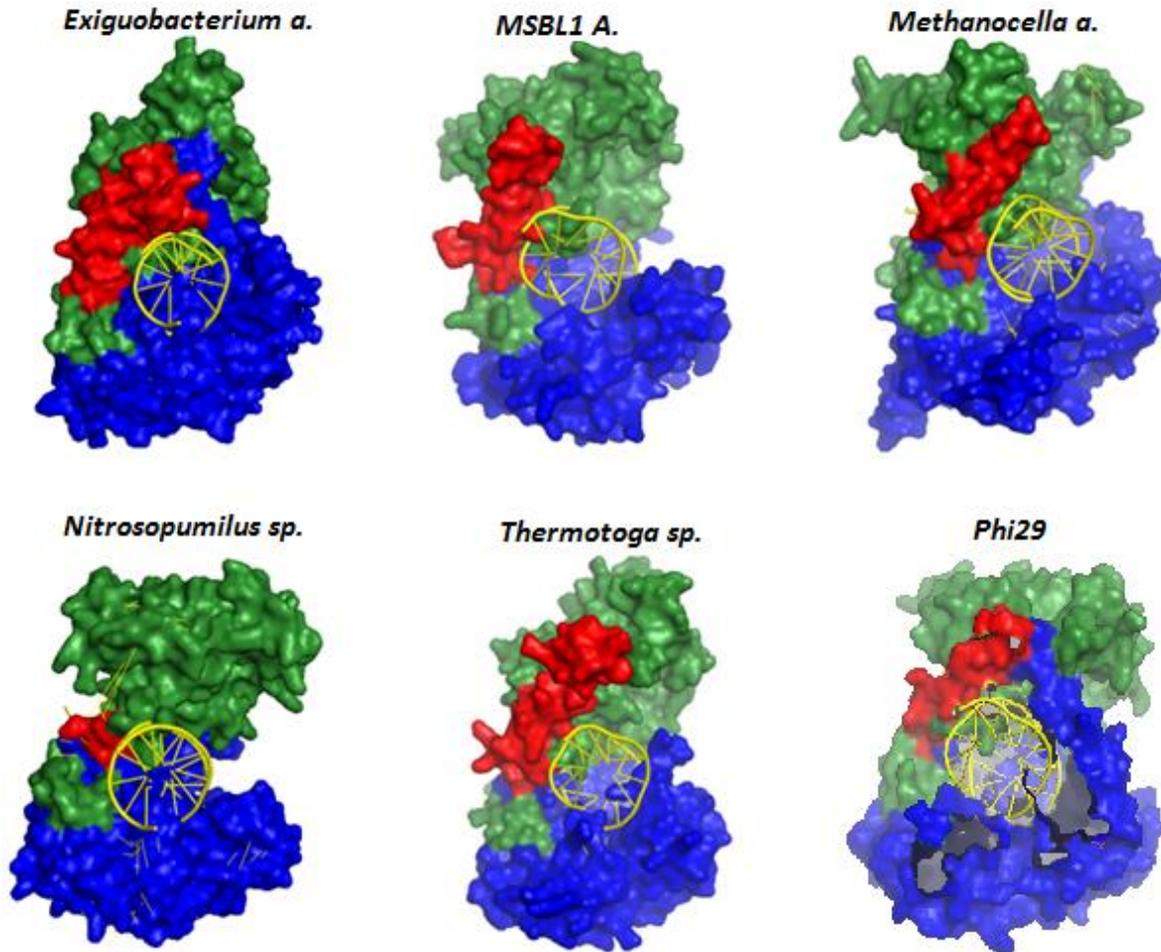


Figura 12. ADN Polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp.*, *Thermotoga sp.* y *Phi29*. Para los Seis casos, se muestra en azul el dominio de polimerasa, de verde el dominio exonucleasa, de rojo el motivo TPR2 y de amarillo el ADN de doble cadena.

De la figura anterior, se puede apreciar que en *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Thermotoga sp.*, y *Phi29* el motivo TPR2 (en color rojo), junto con el dominio de polimerización (en color azul), rodean al ADN entrante, contrario al caso de *Nitrosopumilus sp.*, en el cual su motivo TPR2 siendo tan pequeño, (de solo 5 aminoácidos) que es incapaz de rodear al ADN. Estas diferencias en cuanto a la longitud de los respectivos motivos TPR2 de las 6 polimerasas, pueden ser las que dicten cuál de las polimerasas pueda o no efectuar desplazamiento de hebra, o bien, podrían conferir otras capacidades que no se contemplaban en un principio.

7.2 Sub-clonado de los genes en pET19.

El proceso seguido para la clonación de las 5 polimerasas en pET19 ya fue explicado en la sección de materiales y métodos. Por lo que, en la figura 13, se muestra el corrido de un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio, para verificar que los cinco genes estuvieran clonados en pET19. Como se puede ver, los tamaños de cada gen coinciden con lo reportado en las hojas 23 y 24 del presente estudio, además de que el tamaño de pET19 también coincide con lo reportado, debido a lo anterior, se confirma el éxito del proceso de sub-conado.

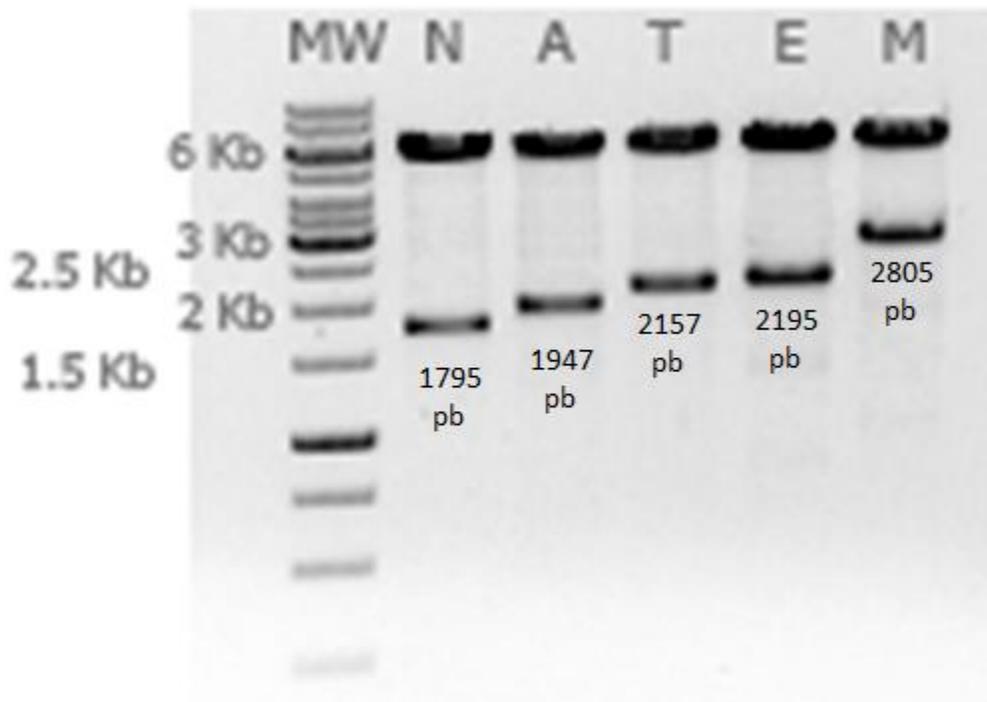


Figura 13. Gel de clonación de *N-Nitrosopumilus sp.*, *A-MSBL1 Archaeon*, *T-Thermotoga sp.*, *E-Exiguobacterium antarcticum* y *M-Methanocella arvoryzae* en pET19. Se muestran los tamaños de cada una de las 5 polimerasas en pares de bases y en orden ascendente. En cada caso se puede ver el fragmento que corresponde a la polimerasa y el fragmento que corresponde a pET19.

7.3 Expresión y Purificación de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp.* y *Thermotoga sp.*

En el primer paso de purificación, cromatografía de afinidad por níquel, se realizaron dos lavados con una concentración ascendente de imidazol de 25 mM a 50 mM para las 5 proteínas, así mismo se eluyeron todas las proteínas a 500 mM de Imidazol, se dejaron por 14 horas en membranas de diálisis, en un buffer con 10% de glicerol. Posteriormente, se corrió un gel de acrilamida al 10% para evaluar si era necesario otro paso de purificación o si sólo con ese paso único era suficiente. Se decidió realizar un segundo paso de purificación dado que las proteínas no se veían limpias. El segundo paso de la purificación fue una cromatografía de intercambio iónico con heparina. Se utilizó una concentración ascendente de NaCl desde 50 mM hasta 2000 mM para las 5 proteínas, se dejaron en membranas de diálisis por 14 horas en un buffer de 50% de glicerol. Se corrió un gel de acrilamida al 10% para evaluar la pureza de las proteínas. En la figura 14 se muestra el gel definitivo de la purificación de las polimerasas de Phi29, *Thermotoga sp.*, *Exiguobacterium antarcticum* y *Methanocella arvoryzae*.

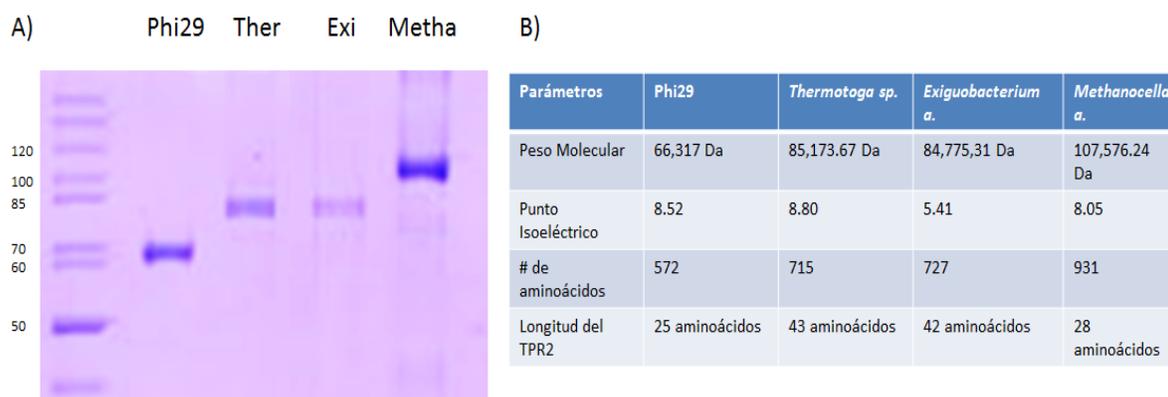


Figura 14. A) Gel de acrilamida de la purificación definitiva. Se muestra la purificación de las polimerasas de Phi29, Ther *Thermotoga sp.*, Exi *Exiguobacterium antarcticum* y Metha *Methanocella arvoryzae* con el marcador de peso molecular en el primer carril. **B) Tabla 4. Parámetros de las Polimerasas Phi29, *Thermotoga sp.*, *Exiguobacterium antarcticum* y *Methanocella arvoryzae*.**

Como se puede apreciar de la figura 14, en el inciso A, se muestra la purificación por cromatografía de intercambio iónico, en la que se muestran solamente tres de las cinco polimerasas; *Thermotoga sp.*, *Exiguobacterium antarcticum* y *Methanocella arvoryzae*,

junto con la Polimerasa de Phi29. Esto se explicará más a fondo en la sección de Discusión. En el inciso B se puede ver una tabla de parámetros de cada una de las polimerasas mencionadas anteriormente.

7.4 *Exiguobacterium antarcticum* y *Methanocella arvoryzae* realizan polimerización y tienen actividad de desplazamiento de hebra moderado, mientras que *Thermotoga sp.*, realiza polimerización y cuenta con actividad exonucleasa.

Los genes de las proteínas *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, se clonaron en el vector pET19 y las construcciones obtenidas se usaron para expresar las proteínas en células de *E. coli*. Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico. El rendimiento de la proteína de *Exiguobacterium antarcticum* fue de 2.5 mg/L de cultivo, el de *Thermotoga sp.*, fue de 2 mg/L de cultivo, (siendo la proteína que peor rendimiento mostró), y, por último, *Methanocella arvoryzae* fue de 9 mg/L de cultivo, siendo la proteína que mejor rendimiento mostró. Después de los dos pasos de purificación, las proteínas presentaron una pureza cercana al 90%. Las proteínas recombinantes purificadas de *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, se utilizaron para realizar ensayos de polimerización. Dichos ensayos fueron realizados con un sustrato de AND de cadena doble formado por un iniciador marcado radioactivamente hibridado a un templado. Como se observa en la figura 15, las polimerasas de *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, así como las de Phi29 y TaqPol, fueron capaces de llevar a cabo la polimerización; aunque cabe mencionar que fue en algunas condiciones en las que hubo una extensión total del producto hasta los 45 nucleótidos, tal fue el caso con las condiciones de 35°, 55° y 75° C de *Thermotoga sp.* y *Methanocella arvoryzae*, la condición de 95° C de la TaqPol y la condición de 35° C de la Phi29. *Exiguobacterium antarcticum* no fue capaz de extender hasta los 45 nucleótidos en ninguna de las condiciones. En cuanto a la actividad 3'→5' exonucleasa, se puede ver en la misma figura 15 que solamente *Thermotoga sp.*, en

las condiciones de 35° y 55° C y Phi29 en la condición de 35° C fueron las que mostraron dicha actividad.

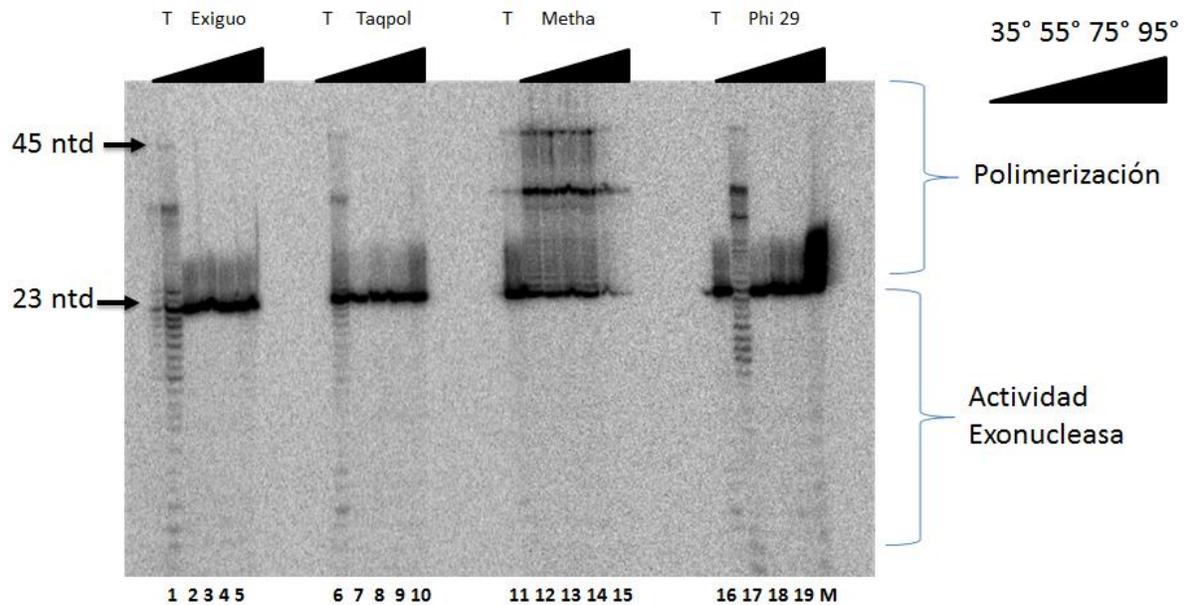


Figura 15. Actividad enzimática de *Thermotoga sp.*, *Exiguobacterium antarcticum* y *Methanocella arvoryzae*. Se muestra en los carriles 1, 6, 11 y 16 las cuatro condiciones de *Thermotoga sp.*, en los carriles 2, 3, 4 y 5 se muestran las cuatro condiciones de *Exiguobacterium antarcticum*, en los carriles 7, 8, 9 y 10 se muestran las cuatro condiciones de la TaqPol, en los carriles 12, 13, 14 y 15 se muestran las cuatro condiciones de *Methanocella arvoryzae*, en los carriles 17, 18, 19 se muestran las cuatro condiciones de Phi29 y en el carril que se muestra como M representa a la marca radioactiva.

Para medir la capacidad de desplazamiento de hebra de las polimerasas de *Methanocella arvoryzae* y *Exiguobacterium antarcticum*, se efectuaron dos experimentos con diferentes fuentes de ADN; se utilizaron pUC19 de 2,686 pb y CITO de 1,000 pb, expresado en pET19 de 5,717 pb para tener dos confirmaciones independientes de la capacidad de amplificación de las polimerasas mencionadas. Es importante resaltar el uso de los primers aleatorizados resistentes a exonucleasas, debido a que la degradación de los primers por la acción de la actividad correctora 3'→5' exonucleasa de Phi29 reduce los rendimientos [9]. La figura 16 muestra la amplificación por desplazamiento múltiple de CITO y pUC19.

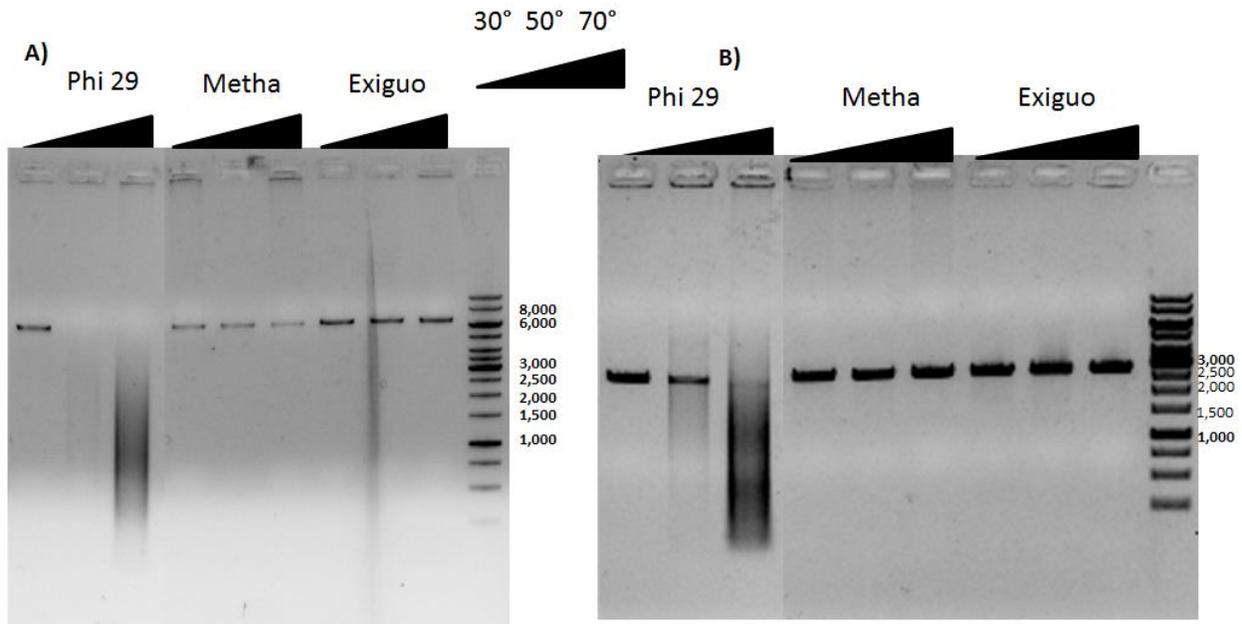


Figura 16. Amplificación por desplazamiento múltiple de A) CITO. Se presentan en los primeros tres carriles las tres condiciones evaluadas para Phi29, de 30°, 50° y 70°C. En los siguientes tres carriles se presentan las tres condiciones evaluadas para *Methanocella arvoryzae* de 30°, 50° y 70°C. En los últimos tres carriles se presentan las condiciones evaluadas para *Exiguobacterium antarcticum* de 30°, 50° y 70°C. Por último se presenta en el último carril la escalera de peso molecular. Las tres enzimas fueron adicionadas a 80 nM en sus respectivas mezclas. Los cortes se hicieron con la enzima HindIII. **B) pUC19.** Se presentan en los primeros tres carriles las tres condiciones evaluadas para Phi29, de 30°, 50° y 70°C. En los siguientes tres carriles se presentan las tres condiciones evaluadas para *Methanocella arvoryzae* de 30°, 50° y 70°C. En los últimos tres carriles se presentan las condiciones evaluadas para *Exiguobacterium antarcticum* de 30°, 50° y 70°C. Por último se presenta en el último carril la escalera de peso molecular. Las tres enzimas fueron adicionadas a 80 nM en sus respectivas mezclas. Los cortes se hicieron con la enzima HindIII.

En la figura 16, se puede ver que para la amplificación de CITO, así como para la de pUC19, la enzima Phi29 muestra su mejor capacidad de amplificación a 30°C, así mismo se observa una amplificación a 50° en pUC19. *Methanocella arvoryzae* muestra amplificación a las tres temperaturas tanto como para CITO como para pUC19; aunque se ve una mayor cantidad de ADN amplificado en el caso de pUC19. Por la imagen, se puede ver que la mejor amplificación fue aquella efectuada por *Exiguobacterium antarcticum*, para ambos casos es la enzima que muestra un mayor grosor en cada una de sus bandas, indicando una mayor presencia de ADN; así mismo, se puede apreciar que muestra una mayor amplificación para pUC19 que para CITO.

8. DISCUSIÓN.

El presente estudio tuvo como objetivo principal el identificar, de entre cinco distintas enzimas ADN polimerasas de la familia B2 *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, *Nitrosopumilus sp.*, y *Thermotoga sp.*, aquellas que tuviesen la capacidad de realizar amplificación de ADN por desplazamiento de hebra. En cuanto a los objetivos secundarios, se tenían: 1) modelar las cinco enzimas ADN polimerasas y su interacción con un substrato de ADN, 2) sub-clonar las cinco enzimas ADN polimerasas en pET19, 3) realizar ensayos de expresión y purificación, 4) realizar ensayos de polimerización y, 5) realizar ensayos de amplificación por desplazamiento de hebra.

En cuanto al modelaje de las cinco enzimas ADN polimerasas, se puede ver en la sección de resultados que, en cuatro de las cinco enzimas, el motivo TPR2 (mostrado en rojo) sirve como una especie de pinza, y que junto con el dominio de polimerización (mostrado en azul) atrapan o abrazan al ADN, y que, en un solo caso, el de *Nitrosopumilus sp.*, su motivo TPR2 es muy corto, siendo sólo de cinco aminoácidos, por lo que no es suficiente para realizar esta labor de abrazadera. Lo anterior podría significar que esta enzima en particular no sería capaz de realizar una amplificación por desplazamiento de hebra, mientras que las cuatro enzimas de *Exiguobacterium antarcticum*, *MSBL1 Archaeon*, *Methanocella arvoryzae*, y *Thermotoga sp.* tienen motivos TPR2 más grandes que el de la ADN polimerasa de Phi29, faltaría únicamente, comprobar si *MSBL1 Archaeon* y *Thermotoga sp.* son o no capaces de realizar una amplificación por desplazamiento de hebra.

Las cinco enzimas ADN polimerasas fueron exitosamente sub-clonadas en el vector pET19 y se mandaron secuenciar para garantizar que en efecto se tuvieran los genes deseados.

A pesar de que las cinco enzimas ADN polimerasas fueron exitosamente expresadas, dos de las cinco enzimas; *MSBL1 Archaeon* y *Nitrosopumilus sp.*, no pudieron ser llevadas hasta la misma pureza que *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, (las cuáles alcanzaron una pureza de 90%, como se puede ver en el gel de la figura 14 inciso A). Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, el buffer en el que se

trabajó con *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, tenía 25 mM de HEPES pH 7.4, además de ese buffer, se probaron otros dos con fosfato de potasio pH 7 y pH 8 y el mismo buffer con HEPES a un pH de 8 para comprobar si resultaría mejor la purificación de *MSBL1 Archaeon* y *Nitrosopumillus sp.*, sin embargo, el resultado fue negativo. Así mismo, se probaron diferentes métodos de purificación de ADN polimerasas que se sabe que funcionan, entre ellos el método de purificación para la polimerasa del fago T7.

En ambos casos (*MSBL1 Archaeon* y *Nitrosopumillus sp.*), se pudo efectuar la purificación por cromatografía de afinidad, pero al igual que las otras tres ADN polimerasas de este estudio, no tenían la pureza requerida para poder efectuar los subsecuentes ensayos de polimerización y amplificación por desplazamiento de hebra, por lo que se intentó un segundo paso de purificación, por cromatografía de intercambio iónico (igual a las otras tres enzimas), lamentablemente, una vez realizado este paso se notó que era muy poca enzima la que se obtenía de cualquiera de las dos, aún así, se intentó concentrarlas por centrifugación, pero a pesar de esto, la concentración de *Nitrosopumillus sp.* y de *MSBL1 Archaeon* seguía siendo muy baja. Debido a lo anterior, se decidió seguir adelante con sólo tres enzimas aptas para avanzar a los siguientes pasos.

Antes de llegar a la decisión de utilizar solamente dos pasos de purificación se tenía un tercer paso de purificación: una cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, dependiendo del punto isoeléctrico de la polimerasa que en ese momento fuera a ser alimentada a la columna, pero se eliminó porque se notó que a pesar de que había un aumento en la pureza de las proteínas, ese aumento era mínimo y, también, de esa manera se podían ahorrar reactivos. Así mismo, antes de llegar a la conclusión de que lo mejor era utilizar los pasos de cromatografía por afinidad seguida de una de intercambio iónico, se intentó probar si una matriz de fosfocelulose resultaría o no útil después del primer paso por afinidad, a pesar de que resultó útil, se notó que las proteínas quedaban más puras con una cromatografía por afinidad seguida de la de intercambio iónico.

En cuanto a las evidencias de que *Exiguobacterium antarcticum*, *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, pueden efectuar polimerización, sería deseable evaluar un rango más fino de temperaturas para así determinar puntualmente la mejor temperatura de trabajo para cada una de dichas enzimas. Al parecer, son *Methanocella arvoryzae* y *Thermotoga sp.*, las dos polimerasas que tienen una mejor actividad, dado que las dos presentan actividad polimerasa en un rango más amplio de temperaturas, además de que son capaces de polimerizar el sustrato de 24 nucleotídos hasta 45 nucleotídos.

En cuanto a la actividad exonucleasa 3'→5' presentada únicamente por *Thermotoga sp.*, sería interesante evaluar más a fondo no sólo esta polimerasa, sino a las cuatro restantes para validar si efectivamente sólo esta enzima tiene la actividad exonucleasa o si las demás también la tienen.

Se encontró por dos repeticiones distintas con diferentes sustratos (pUC19 y CITO), que al menos dos de las cinco enzimas ADN polimerasas, *Exiguobacterium antarcticum* y *Methanocella arvoryzae* presentan la capacidad de amplificación por desplazamiento de hebra a tres temperaturas distintas; 30°, 50° y 70°C.

Como se ha ido mencionando, es importante resaltar que las cinco enzimas ADN polimerasas del presente estudio tienen diferentes motivos TPR2, más importante aún, que difieren en tamaño con respecto al de la polimerasa de Phi29, esto podría significar, que la diferencia en aminoácidos podría conferirles a estas polimerasas alguna otra habilidad como efectuar una síntesis translesional [33] o alguna otra característica deseable, pero no anticipada.

9. CONCLUSIONES.

De manera general, el trabajo realizado fue exitoso debido a que se pudo comprobar que al menos dos de las cinco polimerasas del presente estudio exhiben la capacidad de efectuar amplificación por desplazamiento de hebra, lo cual representa el objetivo general de esta investigación. El hecho de que las enzimas tengan la capacidad de desplazamiento de hebra se debe a las diferencias de extensión de sus respectivos motivos TPR2 con el de Phi29. Así mismo, se desarrolló una metodología probada, alterna a la actual técnica por PCR.

Las conclusiones puntuales son:

- Las polimerasas de *Methanocella arvoryzae* y *Exiguobacterium antarcticum* tienen la capacidad de amplificación de cadena isothermal a 30°, 50° y 70°C.
- La polimerasa de *Methanocella arvoryzae* tiene la capacidad de realizar polimerización a temperaturas de 35°, 55°, 75°C de los 24 nucleótidos hasta los 45 nucleótidos y una menor capacidad a los 95°C; la polimerasa de *Exiguobacterium antarcticum* tiene la capacidad de realizar polimerización a las temperaturas de 35°, 55°, 75° y 95°C aunque no de manera completa; La polimerasa de *Thermotoga sp.*, tiene la capacidad de polimerizar completamente los 24 nucleótidos hasta 45 nucleótidos a las temperaturas de 35°, 55° y 75°C, aunque baja su capacidad a los 95°C.
- La polimerasa de *Thermotoga sp.*, cuenta con actividad exonucleasa 3'→5' a las temperaturas de 35° y 55°C, la cual disminuye significativamente a los 75°C y no existe a los 95°C.

10. PERSPECTIVAS.

Si bien el resultado alcanzado fue exitoso, considero que se debe trabajar en algunas áreas de oportunidad, y para ello, se propone lo siguiente:

- Encontrar la composición exacta de buffers de lavado y elución para realizar ensayos de purificación para las polimerasas de *Nitrosopumilus sp.* y *MSBL1 Archeon*.
- Ensayos de polimerización y de actividad 3'→5' exonucleasa más detallados para las polimerasas de *Methanocella arvoryzae*, *Exiguobacterium antarcticum* y *Thermotoga sp.*
- Ensayos de polimerización y de actividad 3'→5' exonucleasa para las polimerasas de *Nitrosopumilus sp.* y *MSBL1 Archeon*.
- Ensayos de desplazamiento de hebra para las polimerasas de *Thermotoga sp.*, *Nitrosopumilus sp.* y *MSBL1 Archeon*.
- Ensayos de Thermal Shifting para las 5 ADN polimerasas.
- Evaluar la fidelidad de las 5 ADN polimerasas.
- Evaluar si las 5 ADN polimerasas tienen la capacidad de efectuar síntesis translesión.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Garcia-Diaz, M., & Bebenek, K. (2007). Multiple Functions of DNA Polymerases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(2), 105–122. <https://doi.org/10.1080/07352680701252817>
2. Brautigam, C. A., & Steitz, T. A. (1998). Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(1), 54–63. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80010-9](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80010-9)
3. Kelman, Z. (2000). DNA replication in the third domain (of life). *Current Protein & Peptide Science*, 1(2), 139–154. <https://doi.org/10.2174/1389203003381414>
4. Filée, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., & Laurent, J. (2002). Evolution of DNA polymerase families: Evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 54(6), 763–773. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0078-x>
5. Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J. M., Vega, M. de, Blanco, L., & Salas, M. (2000). An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J. Mol. Biol.*, 304(3), 289–300. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4216>
6. Bruck, I., Goodman, M. F., & O'Donnell, M. (2003). The Essential C Family DnaE Polymerase Is Error-prone and Efficient at Lesion Bypass. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44361–44368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308307200>
7. Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry*, 69, 137–165. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)69005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)69005-X)
8. Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C., Salas, M., ... Martins, G. (1989). Highly Efficient DNA Synthesis by the Phage 429 DNA Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 8935–8940.

9. Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., & Lasken, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Research*, *11*(6), 1095–1099. <https://doi.org/10.1101/gr.180501>
10. De Vega, M., Lazaro, J. M., Mencia, M., Blanco, L., & Salas, M. (2010). Improvement of 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(38), 16506–16511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011428107>
11. Kamtekar, S., Berman, A. J., Wang, J., Lázaro, J. M., De Vega, M., Blanco, L., ... Steitz, T. A. (2004). Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29. *Molecular Cell*, *16*(4), 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.019>
12. Rodríguez, I., Lázaro, J. M., Blanco, L., Kamtekar, S., Berman, A. J., Wang, J., ... de Vega, M. (2005). A specific subdomain in phi29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(18), 6407–6412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500597102>
13. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, *239*(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
14. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S.-Y., Landre, P. A., Abrarnson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993). High-level Expression, Purification, and *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Exonuclease Activity. *PCR Methods and Applications*, *2*, 275–287. <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>
15. Eckert, K. A., & Kunkel, T. A. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, *18*(13), 3739–3744. <https://doi.org/10.1093/nar/18.13.3739>

16. Katja Niemann, V. T. (2015). Isothermal Amplification and Quantification of Nucleic Acids and its Use in Microsystems. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(3). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000282>
17. Zanolì, L. M., & Spoto, G. (2013). Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors*, 3(1), 18–43. <https://doi.org/10.3390/bios3010018>
18. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
19. Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*, 46(3), 167–172. <https://doi.org/10.2144/000113072>
20. Johne, R., Müller, H., Rector, A., van Ranst, M., & Stevens, H. (2009). Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology*, 17(5), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.02.004>
21. Lasken, R. S. (2009). Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 450–453. <https://doi.org/10.1042/BST0370450>
22. Eckstein, F. (2014). Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*, 24(6), 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>
23. Carneiro, A. R., Ramos, R. T. J., Dall’Agnol, H., Pinto, A. C., Soares, S. de C., Santos, A. R., ... Silva, A. (2012). Genome sequence of *Exiguobacterium antarcticum* B7, isolated from a biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica. *Journal of Bacteriology*, 194(23), 6689–6690. <https://doi.org/10.1128/JB.01791-12>
24. Mwirichia, R., Alam, I., Rashid, M., Vinu, M., Ba-Alawi, W., Anthony Kamau, A., ... Stingl, U. (2016). Metabolic traits of an uncultured archaeal lineage -MSBL1- from brine pools of the Red Sea. *Scientific Reports*, 6(1), 19181. <https://doi.org/10.1038/srep19181>

25. Sakai, S., Conrad, R., Liesack, W., & Imachi, H. (2010). *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2918–2923. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.020883-0>
26. Park, S. J., Kim, J. G., Jung, M. Y., Kim, S. J., Cha, I. T., Ghai, R., ... Rhee, S. K. (2012). Draft genome sequence of an ammonia-oxidizing archaeon, “*Candidatus Nitrosopumilus sediminis*” AR2, from Svalbard in the Arctic Circle. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6948–6949. <https://doi.org/10.1128/JB.01869-12>
27. Sutcliffe, B., Midgley, D. J., Rosewarne, C. P., Greenfield, P., & Li, D. (2013). Draft Genome Sequence of *Thermotoga maritima* A7A Reconstructed from Metagenomic Sequencing Analysis of a Hydrocarbon Reservoir in the Bass Strait, Australia. *Genome Announcements*, 1(5), e00688-13–e00688-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00688-13>
28. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
29. Shoaib, M., Baconnais, S., Mechold, U., Le Cam, E., Lipinski, M., & Ogryzko, V. (2008). Multiple displacement amplification for complex mixtures of DNA fragments. *BMC Genomics*, 9(1), 415. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-415>
30. Blanco, L., & Salas, M. (1996). Relating structure to function in Phi29 DNA Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* 271(15), 8509–8512.
31. Blasco, M. A., Mendez, J., Lazaro, J., Blanco, L., & Salas, M. (1995). Primer Terminus Stabilization at the phi29 DNA Polymerase Active Site. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(6), 2735–2740.
32. Truniger, V., Blanco, L., & Salas, M. (1999). Role of the “YxGG/A” motif of Phi29 DNA polymerase in protein-primed replication. *Journal of Molecular Biology*, 286(1), 57–69. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2477>

33. Pastor-Palacios, G., López-Ramírez, V., Cardona-Felix, C. S., & Briebe, L. G. (2012). A Transposon-Derived DNA Polymerase from *Entamoeba histolytica* Displays Intrinsic Strand Displacement, Processivity and Lesion Bypass. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049964>

12. APÉNDICES.

12.1 Secuencias de aminoácidos de las cinco enzimas ADN polimerasas del presente estudio.

Secuencia de *Exiguobacterium antarcticum*.

MAKKKQQIEEKPLRLLTLDTETRGLFGEVFRVGLYDGETYYSGYTFPEIYPIIQDLSTRWECHVYVHNLDFDLAKIAKDFITNEMVLDLKKAVAINNQFIVLPSEHMILHDSLRLPMSLERITKSFGLDKEGKIDLSDYLK TTPYAVYKEDGTLDRKSQGYFENVDPDEPMLNEYLEMDCRSLHTVLTMIMEIAHMSLEDFVRCPT AASLSMSVYKAQQPDEYEDATSSNYGATGEMMEEFVRRAYYGGRTVEFTPQLEDGYHYDVNSLYP HVMKENEFPIGYEHIYDPEKARTNYRFWKYRKGAGIAEANVTVPDMHIPPLPTRVEHGKLENKLLFP VGSFTGVWYTYDELEKAEQLGCTVEVTQTTYWYKTAPVFKEFVGYWEDIKNAEGAKREFSKLVQNSLY GKFGMRRETLAPYAMRDELEDKDELFDTFYHTELDMRFLTHITKSKAKYIQPHIAVFTSKARLLLLD GLLQQEKAGSVSYCDTDSIAGTAVMPDDMVHKDDYGKWKLENTIKQIFLQPKLYAEIKGDGKTVIKG KGIPGEKLEDITFTNYEELWHTMGAKKQDSIHLVDGYESRQKFVTLKANKDFDSKVLRKTINLLNEQK RVM DYVNNTSRPHNLDTYEEYSPSEVQEILAYTYLDDDVDQLKEFVKEIGHIRIPAQKTSRFRFEYEQM SRSVRIKYFRKEGRLLDLSFAEAIGWEVNELVEELRMS

Secuencia de *MSBL1 Archaeon*.

MDKFVTIPPYLQDGIDPLKRSYPKINLIVFDVETEEGEPYLITFYNGEESPTYLKVTPENILDKFMKFLID NCPQTKTNLLFAHNLQFDLTVVLNQYENELFYLEPPKLSHELGTFTKIFSQKTWFAQVKLDNGAYVKL IDTGNFFKGSLYNLSRKLNDHKKRSRPFVDEGKKPSNRKEWQKLYLYCGAEIKATYDLAEYILQKHKGYDYITMSAPQFASKVFKKHYLAQRIPQVPEKVRWLAERTIHGGRSDTFVECPILIPDVHYFDYNSFYP WAMANLPPITGGEWEEVDDFVNEFEGFYQVSGYVRECKHPVVLKNAGGMDYASGKRVRRTPPLSSYE LREALDKEEIEIAEITGYIWKPGENSVNPFKPYVGNFYGKKQKTPKNDPYQNFKLLNSLYGKTYQTNR KTDYKEEPRYKVDQETGNVKKNEIRYKAGGIYLPVGSWITSMCRAELHNLHXYDGIDCATDSFKTK RNDVPTGEELGELDHEYEGMLLLIRPKLYLMFSPQVQEEVMNDYGGDLRAWLNANLSTLEESDSIKDL IPKYALHGFWGSPILLKLYQKKENEYLVDMNKIREAIREGKQARKMEERKRSIQIDWTEEVGLCGLK KGEAVKERELCTGACSKCPYVREF

Secuencia de *Methanocella arvoryzae*.

MGRGEQAEYHNAGQPTINNSRIDLVFDTETTTTDRYQNLTFGSCGVWVNGKPDRLIFFDHELPKPST DIIKAYNIQYNTTEKILNDKLPGTTFNSYELMTKEEFVENVLFPYVVFQARANCICFNIPFDITRLAIKFSESRYNNGFSVTLSENPNPRIVIKHIDSKRAFVELTNPDRSKGKKKKRRPFRGNFLDLRTFTFVLTNEGIDL GRALPDFGSKFRKMSPEEHGKITPEYITYNINDTLATYDLYVQALKRYRWYCLDKTPTKLYSPASIGKALL DKIGILPFHFKNPEFPEEILGYVMMGGYGGRTETRIRKEPRITCLDYISMYPVSVLLNMYRFLIAKNILR EDATKDAQTLDDKITPEDIRNKELWNDFTIICELEPNEDKVPVRSSYGNKYALNIGINYLISTDGSTIWTYLD IDLIAAKMDQGKAPRIKRAIRFIPSEPDNLNSITYLKLPPLEPGADLIKYLIERDHIKLMKSPEWEGK KDTEEYRELEISEQILKIANSTSYGIFIQLNPEDADSEEVTFCDQTFEAENVKIEKPGPAFNPIMAVFLTA GSRLILATAEALITRENGYFAYCDTDSIFISPEHVPMIQEFFRDLNPGVHIEDMFKIEDNKSRRKKVCRV

VKLENVWLYAISAKRYVLYHVHDNGAIEILKYSSHGLGHLMNIDEAQIWM DILTLHYHP EEADEIFQRY
KGKYAFSKLAITTYDIWARVNKR NQGKPLKEQIKPFNFILVGT SYRTDPETKQPIIPTW PYN SADDKEFA
KLPYMPFIDYKTGKTYTNPPAAGQEFSTEFY LKPMDEVLYDYVNHPEAKSEGDTGL LKSRYLHINKASIH
RIGKESDDIENSLIFGLPSDSYGEVANIYQAISNLTPKDAGKLGIPERTLRKWKAKIREGKPLNMKNSV IIK
LKRPIESIE

Secuencia de *Nitrosopumilus sp.*

MAESIPVTDYRDL SKVYTKRPQNRNPAHSRLRTVHGIDTETYNGNIFLIADSDGQYLDKITPNSVISWLF
SKKYHGTWNFFYNLSYDAEVILKLLGSELFRYRSTGKLD FWHGNH HLEYFP GKSLRIKKGHHSVLFFDIM
QFFGGSLSNAYEKNIKKLSKEYLDIKSKRSEFTIRHYNHNKKKIRKYCIQDCKLTKE LSEKWITLFSNAFSFY
PAKWTSAGYLAEKVLINNGINLPRFSDTPYSIQELAFKSYFGGRIELIKRFIGKAYLYDINSAYPDAIANF
PDTTKGKWIKRKS IHKDAKLGFFKIQC DIPDDYTIAPFPFKANNVILYPSGKFV TYCTLKE LQACKSNSLYR
ILEGYQWISNSPIYPYRKFIQSLYQKRQKLKQDNNPLEQPIKILNSIYGKTGQKINGVMGNL FNPVMFA
YITGYTRAKLYKFVLKNRLESDIIAFATDSICTTRKLNIDSKRLGDFSYDGE SDFYLQNGFYRFNSIWKQ
RGLGRLGSKEIEHLDTFEKDGKLFYKFRVNRNSRLRSSILSNRIQDIGKIAPITREVN LNADRKRLWL GKIE
SIDQKECNESMTISLNF MNKESV

Secuencia de *Thermotoga sp.*

MKTIRKRREVKRRKWKFGAFDVETWGLDARRFAFGVCVWRDKNGCIQRKVFY NREQMMNFMVSR
RFRGYVWWGHNAGAYDMISLFGNYLQNRNFKVIMNKGRFIKAEYKTGTGHK VYFQDTL NFFGTSLE
KLAQDVANEKLITPDKFKVSLEDEDIIRYMVEAGKWSVEDVMRIYGIQRGSVEAILGGKFERYLEAYDVE
YCIRDAEIVLIAVEKLAEWVYENFRVNLSTIASLSLRIFFTHFLKEDIKVSELDALFRNSY YGGRVEVFRDR
FQWRDVKYDYDFNSLYPSVMYQKEYPDPSSLEYEPFPSKNLIYEFEGVSEVT VYVSEGMDIPPLPIRYNGK
LIFPVG YMRGWWNHNELRMAEKYGAKILKVHRTVYATRITKPFREFVEYFYTLRKKYKEEGNKTYDLFT
KIIMNSLYGKFGQQNEYREIGFIDEERGEDWVFE PFGESDLGEWKKVDENGHV IKAADAKHSILCWGSY
VTSWARIYLYEKMMEVVKKGGKVYYCDTDSIITDMELESGKELGQVKLEGE GKI FLIAPKTYIFDTTEGK
TIKMKGIRNPPDNIREEYHERRVVKVEALRRKKEAGEGEIRVKKPKFIDEKRNWISDTESKPWIYHEL
VAEYTIKKMVKQDVERMWQELQSEKVARNIKEVGDEYRRFKSPKPAWYLDMEKQLGRKPTKKDLED
YMYFVYNQMREEIINQVIKELGGDDVETT

12.2 Motivos TPR2 de las 22 ADN polimerasas representadas en el árbol filogenético.

Organismo	Motivo TPR 2
Phi29	PDVTGKVPYLKENGALGFRLGEEET
<i>Zea mays</i>	PESTTTQIVSTEESRKLALYNDGFVQSYELSSDK
<i>Beta macrocarpa</i>	PKSTKTDIGGIKEYQYRMRQESWLDGDYLGNDK
<i>Silene vulgaris</i>	PEYNKTEICDYERYRILKTFFAEACYFKDRKV
<i>Glycine max</i>	PQSTKTEMCNKSKRDRIFFRRPEFIDDFIREDL
<i>Lachancea kluyveri</i>	PIDKEVYIVKRDVVAGECENLSQNGEIGICIGKRIVKKPKFFNLDGEDYDKMIIER
<i>Rhizophagus irregularis</i>	PSLTKTQFHTQEGIENLSQYWDLKNRIDFGEINLVTLLEAKEWILQNKGEQELIKN
<i>Pleurotus ostreatus</i>	DLNTEMKVIESKDLNFLNKTENVDTLFEFNRLSLIKSHGPLDPEVVDLFSKENLIENKKINPFIED
<i>Neurospora crassa</i>	DSAAEIKMLTTNELDNIQLTNNVIHEFEVDDDKHYVRYDKKPCPVLCQAQSEKNYELLSYLDGE
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	PIAENHIIISNEEALKLYSKKNITNIIDLKNGKELISFFSIPTNS
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PMKTETRLIYKKDGLAFTKFFNDVK
<i>Bacillus thuringiensis</i>	RERIMYADISERDKLEAEGHTVSEIYDMN
<i>Giardia lamblia</i>	PVFKRMNTVDRAGLERELLD
<i>Vibrio shiloi</i>	VKPKKTFVADGYSQPQQP
<i>Trichomonas vaginalis</i>	PIESKITIVDDKDAIRYAIRNYNHIVKFEGLDGSDKTIFKLTCSI
<i>Entamoeba histolytica</i>	PILKETKFFRSQKKFETYWVRNYTDVLYGEPLFGSEIWIMEIKKQI
<i>Methanococcoides burtonii</i>	NPEDKKTDIQVYGLDDFNTSENRFKA
<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	RERETLAPYAMRDELEDKDELFDTFYHTELDMRFLTHITKSK
<i>Methanocella arvoryzae</i>	NPEDADSEEVTFICDQFTFAEVNKIEKP
<i>MSBL1 Archeon</i>	NRKTDYKEEPRYKVDQETGNVKKNEIRYKA
<i>Nitrosopumilus sp.</i>	INGVM
<i>Thermotoga sp.</i>	NEYREIGFIDEERGEDWVFEPFGESDLGEWKKVDENGHVIKAD