

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Expresión y caracterización
funcional de una ADN polimerasa I
de *Geobacillus
stearothermophilus***

Cristian David Estupiñan Molina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia

2024

Expresión y caracterización funcional de una ADN polimerasa I de *Geobacillus stearothermophilus*

Cristian David Estupiñan Molina

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias-Bioquímica

Director:

Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D.

Codirectora:

Dayana Calderón Manrique, M.Sc.

Línea de Investigación:

Desarrollo de Productos Biotecnológicos

Grupo de Investigación:

Biotecnología Molecular (CorpoGen)

Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente
(GERMINA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C, Colombia

2024

*El verdadero conocimiento es ser consciente
de la propia ignorancia.*

Rudolf Virchow

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Cristian David Estupiñan Molina

Nombre

30/01/2023

Fecha

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia que a través de la dirección de becas de posgrado me permitieron financiar gran parte de la maestría. A la Corporación CorpoGen por abrirme las puertas para realizar este trabajo de investigación.

A mis directores el profesor Pedro Filipe de Brito Brandão por su confianza, asesoría y acompañamiento durante todo el proceso y, la profesora Dayana Calderón por sus enseñanzas y acompañamiento durante la ejecución del proyecto. A los profesores que me enseñaron los conocimientos en bioquímica y biología molecular y a la profesora Jimena Sánchez por sus consejos y motivaciones.

Al profesor Alfredo Heriberto que pertenece al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Cinvestav de México, por su gentil donación del plásmido que codifica para la Pol Bst.

A mis compañeros de CorpoGen, Jeisson, Nelly, Valeria, Leidy, Luz Karime, Emerson, Sergio, Juanito y en especial a la directora Patricia del Portillo y la Doctora María Mercedes Zambrano por su confianza para ser su estudiante de maestría.

A Minciencias que brindó gran parte de la financiación del proyecto a través de la convocatoria 895-2021 reactivos, insumos, y metodologías; prevención de enfermedades desatendidas y transmisibles.

A la Universidad de los Andes y en especial a la profesora Adriana por abrirme su espacio y donarme algunos de sus reactivos.

A mi familia por su apoyo y a las personas que ya no están, pero contribuyeron en esta bonita etapa de mi vida.

Resumen

Expresión y caracterización funcional de una ADN polimerasa I de *Geobacillus stearothermophilus*

La ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus* (ADN Pol I Bst), es un miembro de la familia A de las polimerasas, que posee características desplazamiento de hebra que favorecen su aplicación en métodos de amplificación isotérmica. En el presente trabajo se describe la expresión y caracterización funcional de una ADN Pol I Bst, iniciando por la secuenciación del plásmido mediante tecnología Oxford Nanopore, para confirmar la secuencia codificante de la proteína, seguido de un análisis *in silico*, con el propósito de determinar la estructura 3D y sitios activos de la proteína. Posteriormente, se realizó la expresión, extracción, purificación, determinación de la actividad catalítica y análisis de funcionalidad mediante *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) a 65 °C por 60 min, utilizando como sustrato ARN de SARS-CoV-2. Los resultados reflejan una secuencia codificante de 576 aminoácidos que pertenece al fragmento grande de ADN Pol I Bst, el cual tiene peso molecular de 61,8 kDa. Se obtuvo una concentración de 2mg/ml de proteína total, que posee una actividad enzimática de 606.4 U y una actividad específica de 3.0×10^5 U/mg. Finalmente, se demuestra que la proteína es funcional al amplificar una secuencia perteneciente al Orf1a de ARN de SARS-CoV-2. Aquí se presenta una proteína funcional, con libertad de operación para su distribución y que es aplicable a sistemas de amplificación isotérmica para el diagnóstico de enfermedades de importancia clínica.

Palabras clave: (*Geobacillus stearothermophilus*, polimerasa, ADN Pol I Bst, Pol Bst, LAMP, SARS-CoV-2).

Abstract

Expression and functional characterization of a DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus*.

The DNA polymerase from *Geobacillus stearothermophilus* (Bst DNA Pol I) is a member of the A family of polymerases, exhibiting strand displacement characteristics that favor its application in isothermal amplification methods. This study describes the expression and functional characterization of a Bst DNA Pol I, starting with plasmid sequencing using Oxford Nanopore technology to confirm the protein's coding sequence. This is followed by in silico analysis to determine the protein's 3D structure and active sites. Subsequently, expression, extraction, purification, determination of catalytic activity, and functionality analysis were performed using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) at 65 °C for 60 min, with SARS-CoV-2 RNA as the substrate. The results reveal a coding sequence of 576 amino acids belonging to the large fragment of Bst DNA Pol I, with a molecular weight of 61.8 kDa. A protein concentration of 2 mg/ml was obtained, exhibiting enzymatic activity of 606.4 U and a specific activity of 3.0×10^5 U/mg. Finally, it is demonstrated that the protein is functional in amplifying a sequence belonging to the Orf1a of SARS-CoV-2 RNA. While optimization studies are important to enhance the protein production process, this study presents a functional protein with operational freedom for distribution and applicability in isothermal amplification systems for the diagnosis of clinically significant diseases.

Keywords: (*Geobacillus stearothermophilus*, polymerase, Pol I Bst DNA, Pol Bst, LAMP, SARS-CoV-2).

Contenido

Resumen	VII
Abstract.....	VIII
Contenido.....	IX
Lista de figuras	XI
Lista de tablas.....	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIII
Introducción.....	1
1 Marco teórico	3
1.1 Las polimerasas.....	3
1.1.1 Familia A.....	4
1.1.2 Familia B.....	4
1.1.3 Familia C.....	5
1.1.4 Familia D.....	5
1.1.5 Familia X.....	5
1.1.6 Familia Y.....	5
1.1.7 Familia RT.....	6
1.2 ADN polimerasa I de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (ADN Pol I Bst)	6
1.3 Coronavirus	9
1.3.1 Transmisión y manifestaciones clínicas de SARS-CoV-2.....	9
1.3.2 Diagnóstico del SARS-CoV-2.....	10
1.4 Amplificación isotérmica mediada por bucle LAMP	11
2 Justificación.....	13
3 Planteamiento del problema.....	15
4 Objetivos	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos específicos	17
5 Materiales y métodos.....	17
5.1 Secuenciación de plásmidos.....	17
5.1.2 Preparación de librerías genómicas	17
5.1.3 Análisis de datos de secuenciación.....	17
5.1.4 Análisis de secuencias	17

5.1.5	Predicción de la estructura 3D de la proteína.....	17
5.2	Producción de proteínas por expresión heteróloga.....	17
5.2.1	Sistema de expresión.....	17
5.2.2	Expresión y extracción de proteínas.....	17
5.2.3	Verificación de la expresión de proteínas mediante SDS-PAGE.....	18
5.2.4	Purificación de proteínas.....	19
5.2.5	Cuantificación de proteínas por Método de Bradford.....	19
5.3	Determinación de la actividad enzimática.....	19
5.4	Determinación de funcionalidad.....	20
6	Resultados y discusión.....	22
6.1	Secuenciación de plásmido y análisis de secuencia.....	22
6.2	Análisis in silico para la determinación de la estructura 3D y sitio catalítico de Pol Bst.....	23
6.2.1	Alineación de secuencia basada en la estructura.....	23
6.2.2	Determinación de la estructura 3D de Pol Bst.....	25
6.2.3	Determinación del sitio catalítico de Pol Bst.....	26
6.3	Resultados del primer objetivo: “Producir una enzima ADN polimerasa I mediante expresión heteróloga”.....	27
6.3.1	Expresión de Pol Bst.....	27
6.3.2	Purificación de Pol Bst por cromatografía de intercambio iónico (IEC).....	29
6.4	Resultados objetivo 2: “Determinar la actividad enzimática de la ADN polimerasa I expresada”.....	32
6.5	Resultado objetivo 3: “Determinar la funcionalidad de la ADN polimerasa expresada mediante reacción isotérmica”.....	35
7	Conclusiones.....	37
7.1	Recomendaciones.....	37

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura en 3D cristalizada de Pol Bst.	7
Figura 2. Esquema de amplificación isotérmica mediada por bucle.	12
Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de ADN Pol I Bst con Pol Bst.	24
Figura 4. Alineamiento de la estructura 3D entre Pol Bst y 4B9L. (A).	25
Figura 5. Determinación del sitio catalítico de Pol Bst. (A).	26
Figura 6. La proteína Pol Bst se expresa cuando se induce con IPTG al 1 mM.	27
Figura 7. La adición de glucosa reprime la expresión basal de la Pol Bst.	29
Figura 8. Cromatografía de intercambio iónico (en inglés IEC) (A).	30
Figura 9. Concentración de proteína total Pol Bst.	31
Figura 10. Diluciones seriadas para la determinación de la velocidad inicial de Pol Bst.	32
Figura 11. Determinación de la velocidad inicial (unidad de fluorescencia/minuto) de Pol Bst.	33
Figura 12. Determinación de la actividad enzimática en función del número de nucleótidos sintetizados.	34
Figura 13. Pol Bst es funcional al amplificar ARN de SARS-CoV-2.	35

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Miembros más representativos de las ADN polimerasas.....	3
Tabla 2. Secuencia de cebadores LAMP para la detección SARS CoV-2.....	21
Tabla 3. Determinación de la actividad enzimática de Pol Bst.	34
Tabla 4. Determinación de la actividad específica de Pol Bst.	34

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
δ'	Delta prima
ϵ	Epsilon
ζ	Zeta
η	Eta
θ	Theta
ι	Iota
κ	Kappa
λ	Lambda
μ	Mu
τ	Tau
ψ	Psi

Abreviaturas

Abreviatura	Término
μL	Microlitros
3D	Tridimensional
ACE-2	Angiotensina 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato
AMV	Virus de la mieloblastosis aviar
ARN	Ácido ribonucleico
BF	Fragmento grande
BIP	Cebador interno reverso
BLAST	Secuencia con la herramienta de búsqueda de alineación local básica
BME	2-Mercaptoetanol
Bst	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

<i>dNMP</i>	Desoxinucleósido monofosfato
<i>dNTP</i>	Desoxinucleósido trifosfato
<i>DTT</i>	Ditiotreitol
<i>FANA</i>	Ácido nucleico 2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabino
<i>FIP</i>	Cebador interno directo
<i>g.</i>	Gravedades
<i>GNA</i>	Ácido nucleico de glicerol
<i>hTERT</i>	Telomerasa transcriptasa inversa en humanos
<i>IEC</i>	Cromatografía de intercambio iónico
<i>IGg</i>	Inmunoglobulina G
<i>IPTG</i>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<i>kDa</i>	kiloDalton
<i>KF</i>	Klenow fragment
<i>LAMP</i>	Loop Mediated Isothermal Amplification
<i>LB</i>	Luria-Bertani
<i>M.W</i>	Peso molecular
<i>MERS-Co</i>	Síndrome Respiratorio de Oriente Medio Coronavirus
<i>mg</i>	Miligramos
<i>Min.</i>	Minutos
<i>mL</i>	Mililitros
<i>mM</i>	Milimolar
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>ORF</i>	Marcos abierto de lectura
<i>pb</i>	Pares de bases
<i>PCR</i>	Reacción en cadena polimerasa
<i>PDB</i>	Protein Data Bank
<i>pmol</i>	Picomoles
<i>Pol</i>	Polimerasa
<i>RdRp</i>	ARN polimerasa dependiente de ARN
<i>RT</i>	Retrotranscripción
<i>RT-qPCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real con Transcriptasa Inversa
<i>SARS-CoV-2</i>	Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus
<i>SDS</i>	Dodecilsulfato de sodio
<i>snRNA</i>	Pequeños ARN nucleares
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tdt</i>	Transferencia terminal
<i>TNA</i>	Ácido treosa nucleico
<i>U</i>	Unidades catalíticas
<i>XNA</i>	Ácidos xenonucleicos

Introducción

Las polimerasas son actores centrales de la replicación y la reparación, de forma precisa y eficiente del material genético. Se conocen gran variedad de polimerasas que se clasifican entre sí por diferentes familias (A, B, C, D, X, RT) y esa agrupación está determinada por diferencias en la estructura primaria que conllevan a cambios en las subunidades de los sitios catalíticos de cada familia (Bebenek, 2004).

Las polimerasas más estudiadas corresponden a la familia A, entre ellas se clasifica la ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus* (ADN Pol I Bst), identificada por primera vez en 1995 y posteriormente clonada, purificada y caracterizada bioquímicamente como un fragmento grande BF o Pol Bst (como se llamara de aquí en adelante), que además de su actividad de síntesis de ADN, posee, actividad innata de retrotranscripción del ARN (Shi et al., 2015), capacidad para sintetizar plantillas de ARN modificados (Jackson et al., 2019) y capacidad de desplazamiento de cadena (Oscorbin & Filipenko, 2023a), pero carece de actividad exonucleasa 3'-5' (Kiefer et al., 1997a).

Los sistemas diagnósticos moleculares en su mayoría dependen de la capacidad replicativa de las polimerasas para su funcionamiento. No obstante, su finalidad en cada método va a depender de las características bioquímicas de cada enzima (Aschenbrenner & Marx, 2017). Por ejemplo, en la amplificación isotérmica de ADN, la Pol Bst cumple una función importante dadas a las características de desplazamiento de cadena que posee, lo cual representa una ventaja frente a otras técnicas moleculares porque se evitan ciclos de amplificación que requieren tecnología robusta para su aplicación. Una de las técnicas más destacadas es la LAMP (En inglés, *Loop Mediated Isothermal Amplification*), la cual emplea 2 o 3 pares de cebadores diseñados específicamente para unirse a una región particular del ADN y mediante la síntesis de la polimerasa, se genera una estructura en forma de mancuerna que actúa como plantilla para la amplificación, generando múltiples copias dispuestas en serie, denominadas concatémeros (Nagamine et al., 2002; Notomi et

al., 2000a; Ocorbin & Filipenko, 2023a). Esta técnica ha alcanzado un importante desarrollo al ser aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como método diagnóstico para tuberculosis pulmonar (Bentaleb et al., 2016) y SARS-CoV-2 (Kashir & Yaqinuddin, 2020).

Aunque el desarrollo y comercialización de productos biotecnológicos y de diagnóstico han favorecido a la investigación y a la medicina para la detección de enfermedades en el mundo. También pone en manifiesto la dependencia de Colombia frente a la importación de dichos recursos y su incapacidad que hasta el momento se ha manifestado. Lo que hace que se ponga en discusión, el objetivo de avanzar hacia la independencia biotecnológica del país, con el fin de prevenir amenazas futuras (Ramírez et al., 2019), tal como se demostró en la pandemia del SARS-CoV-2.

Esta necesidad, que incluye la producción de insumos entre ellas las polimerasas, se trata dar solución en este estudio, al expresar, purificar y caracterizar funcionalmente una Pol Bst que se presenta como un potencial insumo biotecnológico, que favorecerán la producción de kits diagnósticos moleculares para detección de enfermedades de importancia clínica en el país en un presente y futuro.

1 Marco teórico

1.1 Las polimerasas

Las polimerasas (Pol) desempeñan un papel central en los procesos de replicación y reparación del ADN, asegurando una transmisión precisa y eficiente de la información del material genético. Estas enzimas catalizan la síntesis de ADN a partir de desoxinucleósido trifosfato (dNTP) incorporándolo a la cadena creciente en forma de desoxinucleósido monofosfato (dNMP) (Shanbhag et al., 2018). Hay una gran variedad de polimerasas clasificadas en diferentes familias, como se muestra en la Tabla 1. Esta clasificación se determina por las diferencias en la estructura primaria que resultan en cambios en las subunidades de los sitios catalíticos de cada familia (Bebenek, 2004).

Tabla 1. Miembros más representativos de las ADN polimerasas.

Familia	Procariotas	Eucariotas	Arqueas	Virus
A	Pol I	Pol γ, θ	Pol BI, BII	Pol T3, T5, T7
B	Pol II	Pol $\alpha, \delta, \epsilon, \zeta$		Pol Adenovirus, HSV, RB69, T4, T6
C	Pol III DnaE, Pol C			
D			Pol D	
X		Pol $\beta, \lambda, \mu, \text{Tdt}$		
Y	Pol IV, V	Pol η, ι, κ		
RT	Maturasas	hTERT		Retrotranscriptasas

Las polimerasas que comparten homología con la pol I, II y III de *Escherichia coli* se asignan a las familias A, B y C, mientras las que no, están asignadas en la familia X (Delarue et al., 1990). Asimismo, la familia D es específica de arqueas (Mayanagi et al., 2020) y la familia Y, se encuentra tanto en procariotas como en eucariotas (Ohmori et al., 2001). Por otro lado, la familia RT denominadas como transcriptasas reversas, sintetiza

ADN a partir de ARN e incluyen, RT de retrovirus (Sluis-Cremer, 2021), telomerasas (O'Reilly et al., 1999) y las RT codificadas por el grupo II de intrones (maturasas) (Zhao y Pyle, 2016).

1.1.1 Familia A

Las polimerasas más estudiadas corresponden a la familia A, principalmente la aislada de *E. coli* ADN polimerasa I (Kornberg, 1960). Posee dos dominios: exonucleasa 5'-3' y exonucleasa correctora 3'-5' que constituyen una parte fundamental en los procesos de maduración de los fragmentos de Okazaki (Kornberg A y Baker T., 1992) y un dominio de polimerización que, aunque en *E. coli* y otras especies bacterianas ejerce una función menor durante la replicación, en otros organismos, desempeñan casi la mayor parte de esta función, especialmente en la replicación mitocondrial en eucariotas (Pol γ) y la Pol T7 en fagos (Doublé y Ellenberger, 1998; Graziewicz et al., 2006).

1.1.2 Familia B

Por otro lado, en la familia B se encuentran las polimerasas replicativas más importantes en eucariotas. Están constituidas por múltiples subunidades, siendo los más comunes el N-terminal; que, aunque no se conoce completamente su función en eucariotas, se asocia al reconocimiento del uracilo en arqueobacterias (Fijalkowska et al., 2005)., el dominio exonucleasa 3'-5' que tiene la función de corrección de errores, y el dominio ADN polimerasa que se caracteriza por su alta procesividad y fidelidad al replicar el genoma en eucariotas superiores. En eucariotas se conocen tres polimerasas pertenecientes a la familia B: la Pol δ , que tiene función de alargamiento de los fragmentos de Okazaki mientras que la Pol ϵ tiene función de alargamiento de la cadena principal de ADN (Shcherbakova et al., 2003). Asimismo, Pol ζ , que es una enzima que media la reparación inducida por daños en el ADN (Martin & Wood, 2019), misma función asociada para la Pol II en procariontes (Fijalkowska et al., 2005). Sumado a esta familia, se encuentran las Pol pertenecientes a virus tales como: la Pol de adenovirus; que contiene secuencias conservadas que se comparten con las ADN polimerasas de eucariotas (regiones I, II y III), y, además, posee actividad correctora exonucleasa 3'-5' y de desplazamiento de cadena (Wardle et al., 2008). Asimismo, algunos virus utilizan la Pol del bacteriófago T4 y RB69

que comparten similitud filogenética, actúan como la principal enzima de replicación (Karam & Konigsberg, 2000).

1.1.3 Familia C

Las principales polimerasas replicativas del cromosoma en procariotas pertenecen a la familia C. En *E.coli* la Pol III representa la enzima más importante en los procesos de duplicación, cuenta por lo menos 10 subunidades α , ϵ , θ , τ , γ , δ , δ' , χ , ψ y β , con funciones específicas, siendo la α y la ϵ las responsables de actividad polimerasa y exonucleasa 3'-5' respectivamente (Mo & Schaaper, 1996). Asimismo, las Pol DnaE y Pol C son enzimas replicativas, la primera actúa en la síntesis de la cadena principal y la segunda en la cadena retardada (Bruck et al., 2003).

1.1.4 Familia D

La familia D, hacen parte las polimerasas claves en la replicación del cromosoma en arqueas (Mayanagi et al., 2020). La Pol D, se considera como la única polimerasa que realiza procesos de replicación tanto en la cadena adelantada, como en la retrasada, así como actividad exonucleasa de corrección 3'-5' (Greenough et al., 2014).

1.1.5 Familia X

Las polimerasas de la familia X se distribuyen en diferentes organismos, incluyendo eucariotas, algunas bacterias y virus. Se conocen como polimerasas β , λ y μ y transferasa terminal (Tdt) (Yamtich & Sweasy, 2010). Generalmente, cumplen funciones de adición de segmentos cortos de ADN que corresponden al llenado de espacios durante la reparación del ADN (Uchiyama et al., 2009), pero carecen de dominios de corrección, de fidelidad y la síntesis de ADN es mucho menor con respecto a otras polimerasas (Yamtich & Sweasy, 2010).

1.1.6 Familia Y

Las polimerasas miembros de la familia Y se caracterizan por no poseer actividad exonucleasa y una baja fidelidad en secuencias de ADN no dañado, pero sí, poseen la capacidad de síntesis del ADN dañado, al acomodar moléculas distorsionadas gracias a una bolsa suelta en su sitio activo que le otorga unión al ADN para el par de bases naciente

(Ling et al., 2001). Se cree que el papel fundamental de las polimerasas está ligado a reparación en los procesos de replicación, principalmente si la célula no logra reparar los daños durante su duplicación (Prakash et al., 2005). Un ejemplo de ello es la Pol η , la cual se asume que está especializada en evitar dímeros de pirimidina inducidos por la exposición a la luz UV (Garcia-Diaz & Bebenek, 2007).

1.1.7 Familia RT

La familia de las transcriptasas (RT), son enzimas que contienen dos dominios proteicos separados: uno que lleva a cabo la síntesis de ADN complementario a partir de una molécula de ARN y otro con actividad Rnasa H que degrada plantillas de ARN, especialmente cuando se forman híbridos de ARN/ADN. Estas enzimas desempeñan un papel fundamental en la replicación retroviral (Huber et al., 2023). Sin embargo, también están codificadas en eucariotas como: transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) (Kelleher et al., 2002); que tiene función de extender los cromosomas mediante la transcripción inversa a partir de su plantilla de ARN (Huber et al., 2023), asimismo, tiene la capacidad unirse al ADN mitocondrial y evita el estrés oxidativo, aumenta la cadena respiratoria y favorece la protección de la célula al daño. A su vez, la TERT dirige a las mitocondrias a un control eficaz de la inducción a la apoptosis (Haendeler et al., 2009). Por otro lado, las transcriptasas reversas que también están codificadas por un intrón del grupo de intrones del grupo II (ribozimas) en procariotas, cumplen la función naturalmente para dar origen a los snRNA (Haendeler et al., 2009).

1.2 ADN polimerasa I de *Geobacillus stearothermophilus* (ADN Pol I Bst)

La ADN polimerasa I completa de *Geobacillus stearothermophilus* (ADN Pol I Bst) es codificada por un gen con tamaño de 2850 pares de bases (pb) y miembro de la familia A que fue clonado e identificado por primera vez en 1995, que se caracteriza por poseer tres dominios fundamentales: exonucleasa 5'-3', exonucleasa 3'-5' y polimerasa de ADN 5'-3' (Phang et al., 1995). Posteriormente, se clonó, expresó en *E.coli*, purificó y caracterizó bioquímicamente una parte de la secuencia completa de la ADN Pol I Bst como un fragmento grande (BF, por sus siglas en inglés) que fue aislado de *B. stearothermophilus* el cual crece a una temperatura óptima de 70 y 72 °C. Este fragmento, que contiene un

gen de 1776 pb, que codifica 592 aminoácidos del extremo C-terminal de la enzima. Pol Bst presenta capacidad de desplazamiento de cadena muy robusta y eficiente que permiten separar las cadenas de ADN de manera isotérmica evitando así los ciclos de amplificación, sin embargo, carece de actividad de corrección exonucleasa 3'-5', y su tamaño molecular se estima en aproximadamente 67.7 kiloDalton (kDa) (Kiefer et al., 1997b).

La estructura de Pol Bst se divide en dos dominios principales (**Figura 1**): el N-terminal donde se ubican residuos del dominio exonucleasa 3'-5' y en el extremo C-terminal que posee el dominio polimerasa que se asemeja a la mano derecha con subdominios "dedos", "palma" y "pulgar" los cuales definen la hendidura donde se acomoda el ADN bicatenario. Los subdominios dedos y pulgar están conformados por láminas α helicoidales y el dominio palma por cinco láminas β ubicadas de forma antiparalela muy conservado también en enzimas Pol I, KF y Taq polimerasa (Kiefer et al., 1997).

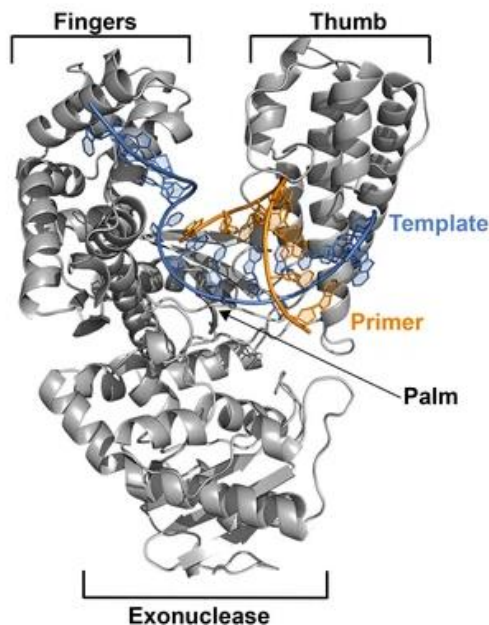


Figura 1. Estructura en 3D cristalizada de Pol Bst. Se indican los subdominios en gris y el material genético; plantilla en azul y cebador en amarillo. Estructura almacenada en Potein Data Bank (PDB) con código 6DSY. Tomada de Jackson et al., (2019).

La Pol Bst posee una procesividad de 14 veces mayor al valor de el fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* (KF) (Astatke et al., 1995) y la eficiencia catalítica es 35 veces mayor con respecto a KF que es cuatro veces mayor que Taq polimerasa cuando se utiliza

como sustrato material genético del fago M13 (Kiefer et al., 1997a), esta característica de Pol Bst, podría estar ligada a la rigidez del subdominio pulgar al restringir la transición del ADN a otros sitios activos de la proteína. Además, se ha informado que la tasa de error de Pol Bst es de 15×10^{-6} , muy semejante otras ADN polimerasas de la misma familia (Oscorbin & Filipenko, 2023b).

Como todas las polimerasas, la Pol Bst adiciona nucleótidos preferiblemente de desoxiadenosín trifosfato dATP al extremo 3' de una cadena de ADN en proceso de elongación (Güixens-Gallardo et al., 2016) y como mecanismo de estabilización de nucleótidos utiliza cationes divalentes de Mg^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} , mientras que Co^{2+} y Mn^{2+} otorgan mayor eficiencia en la incorporación, el Mg^{2+} favorece un menor rango de error en la adición de nucleótidos (Oscorbin & Filipenko, 2023b). Actúa a un pH óptimo de 8,8 y temperatura optima de 65 °C alcanzando su inactividad a temperaturas superiores de los 70 °C (Sellmann et al., 1992).

La actividad de desplazamiento es la capacidad que tiene Pol Bst de separar ADN dúplex aguas arriba a la horquilla de replicación, esta característica es muy común en polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 3'-5'. Sin embargo, para Pol Bst no se conocen estudios estructurales que describan esta capacidad (Oscorbin & Filipenko, 2023). No obstante, estudios previos en KF determinaron que el residuo F771 estaba implicado en la actividad de desplazamiento en esta enzima (Singh et al., 2007), por lo cual se podrían inferir que el residuo Y719 (análogo de F771 en Pol Bst) sería el responsable clave en el subdominio "dedo" para favorecer la actividad de desplazamiento en Pol Bst (Oscorbin & Filipenko, 2023b).

Las ADN polimerasas pertenecientes a la familia A poseen la capacidad de utilizar ARN como plantilla y generar una hebra de ADN mediante una transcripción inversa. Esta observación se realizó por primera vez en Taq polimerasa (Jones & Foulkes, 1989) y también se observa en Pol Bst, cuando se sintetizan ADNc de 65b se obtiene la misma eficiencia con respecto a la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (en inglés AMV RT). Sin embargo, a fragmentos más largos la eficiencia en la síntesis tiende a disminuir (Shi et al., 2015).

La Pol Bst, es capaz de utilizar como sustratos ácidos xenonucleicos (XNA) como: el ácido nucleico 2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabino (FANA) (Wang et al., 2018), ácido nucleico de

glicerol (GNA)(Tsai et al., 2007) y ácido treosa nucleico (TNA) (Dunn & Chaput, 2016). Según registros cristalográficos esta cualidad está ligada a la adaptación geométrica que tiene la enzima en su sitio activo hacia el sustrato de XNA (Jackson et al., 2019).

1.3 Coronavirus

Los coronavirus de la familia *Coronaviridae*, son virus envueltos de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario con una longitud de 26-32 kilo pb de sentido positivo protegido por un capuchón 5', poseen aproximadamente 14 marcos abiertos de lectura (ORF) y su replicación tiene lugar en el citoplasma de la célula infectada. Se clasifican en cuatro tipos α , β , γ y δ (Marra et al., 2003; Su et al., 2016). Los murciélagos se les considera como los principales reservorios de los coronavirus tipo α y β , ya que varios aislamientos han demostrado similitudes con SARS-CoV 2003 humano, principalmente en la secuencia genómica como también en los receptores de unión a la célula (Hu et al., 2015; Su et al., 2016). Los coronavirus que infectan a humanos corresponden a dos de tipo α -coronavirus (HCoV-229E 1966 y HCoV-NL63 2004) y cinco de tipo β -coronavirus (HCoV-OC43 1967, SARS-CoV 2003, HCoV-HKU1 2005, MERS-Co 2012) (Alipoor et al., 2021), y el SARS-CoV-2 que tuvo su primer reporte en Wuhan China (Zhu et al., 2020).

El SARS-CoV-2 es una β -coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo, que posee un genoma de 29.903 nucleótidos de 10 ORF. El primer ORF codifica polipéptidos del complejo replicasa viral y los restantes codifican para proteínas estructurales: proteínas de punta (S), envoltura (E), nucleocápside (N) y proteínas de membrana (M) (Alipoor et al., 2021). Este virus es el responsable de la más reciente pandemia que ha dejado, hasta el momento, más de 702 millones de contagios y más de 6.9 millones de muertes en todo el mundo (Worldometer, 2024); y en Colombia se han confirmado 6,369,916 casos y atribuido 142,780 muertes(INS, 2024).

1.3.1 Transmisión y manifestaciones clínicas de SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se transmite por boca o nariz a través de gotas respiratorias que se producen al hablar, gritar, toser y estornudar, sobre todo cuando se está en contacto con una persona infectada a menos de 2 metros (Molero et al., 2021). El virus entra a la célula empleando el convertidor de angiotensina 2 (ACE-2) (Beyerstedt et al., 2021) y conduce a manifestaciones clínicas que suelen ser desde enfermedad aguda leve, moderada o grave,

pero también puede ser asintomática. Los síntomas del SARS-CoV-2 son muy amplios y van desde fiebre, tos, dificultad para respirar, dolor muscular, confusión, dolor de cabeza, dolor de garganta, rinorrea, dolor en el pecho, diarrea, náuseas y vómitos. Los casos más graves presentan neumonía bilateral, conduciendo a un síndrome de dificultad respiratoriaguda que conlleva a una insuficiencia orgánica múltiple hasta causar su muerte (Palacios et al., 2021).

1.3.2 Diagnóstico del SARS-CoV-2

El diagnóstico de SARS-CoV-2 se realiza mediante pruebas de detección rápida de antígeno especialmente en infecciones activas que van dirigidas hacia anticuerpos humanos IgM, IgG y/o IgA o hacia antígenos al identificar proteínas de nucleocápside (N) o de espiga (S), siendo el N, por ser el más conservado, el más utilizado. Sin embargo, esta prueba se utiliza como complementaria a la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real con Transcriptasa Inversa RT-qPCR debido a que carece de sensibilidad y podría arrojar resultados falso negativos (Neagu et al., 2021; Vandenberg et al., 2020); o en la detección directa a través de la RT-qPCR, diseñada para amplificar regiones del ARN viral como el orf1 (a, b) y genes envoltura (E), nucleocápside (N), espiga (S) y secuencias de ARN polimerasa dependiente de ARN(RdRp) (Abbasi et al., 2022) Además, se han utilizado varios métodos de amplificación isotérmica como LAMP, la cual se ha diseñado para amplificar el gen N, ORF1ab, S y E de SARS-CoV-2(Aidelberg et al., 2021; Hurtado et al., 2022).

1.4 Amplificación isotérmica mediada por bucle LAMP

LAMP es la técnica más utilizada dentro de las demás técnicas de amplificación isotérmicas el cual ha sido aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como método diagnóstico de tuberculosis pulmonar (Bentaleb et al., 2016) y SARS-CoV-2 (Kashir & Yaqinuddin, 2020). Es una técnica basada en la síntesis de ADN por desplazamiento de hebras realizada por una polimerasa que posee esta propiedad y se combinan con dos cebadores internos y dos externos los cuales se pueden ampliar a seis para la aceleración de la amplificación (Oliveira et al., 2021).

Una reacción isotérmica se lleva a cabo a una temperatura de 65 °C durante 1 hora mediante la adición de un fragmento grande de ADN polimerasa (**Figura 2**). En la primera fase el cebador interno denominado cebador interno directo (FIP) (en inglés, *forward inner primer*) que contiene la secuencia (F1c) unida mediante un espaciador TTTT a la secuencia F2, la cual se une complementariamente al sitio F2c de la molécula de ADN objetivo. A partir de este cebador, la polimerasa extiende la nueva cadena complementaria (**estructura 2**). Posteriormente, el cebador F3 se une a su sitio complementario F3c del ADN, y a medida que la polimerasa extiende la nueva hebra, va desplazando la cadena anteriormente sintetizada (**estructura 3**). Esta cadena que ha sido desplazada puede formar un bucle que se une a través de la secuencia F1c del cebador al complementarse al sitio F1 del ADN objetivo. Además, esta misma cadena sirve como plantilla para la síntesis de una nueva cadena de ADN, al unirse el cebador inverso (BIP) (en inglés, *backward inner primer*) que contiene una secuencia B2 y se une al sitio de B2c del ADN (**estructura 5**) una vez sintetizada la nueva cadena de ADN, se une el cebador B3 complementario al sitio B3c (**estructura 6**). El desplazamiento de cadena conlleva a la formación de una secuencia de ADN en forma de mancuerna, que rápidamente se convierte en un tallo-bucle, esta cadena sirve como material de partida para el ciclo de LAMP correspondiente a la segunda fase, a la cual se hibrida FIB (**estructura 8**). La activación de síntesis por desplazamiento genera una copia intermedia de ADN en forma de tallo-bucle invertida (**estructura 11**) a la cual se une un cebador BIP, la síntesis y actividad por desplazamiento (**estructura 12**), genera una secuencia en forma de tallo-bucle idéntica a la estructura 8, un ADN reparado con un tallo alargado al doble de su longitud con copias dobles de la secuencia objetivo y un bucle en el extremo opuesto

(**estructura 13**). Estas estructuras sirven como plantilla para ciclos posteriores y se conoce como fase elongación y reciclaje, lo que conduce a que la reacción de LAMP se amplifique tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN en forma tallo-bucle en el que se incluyen cebadores FIB y BID (Notomi et al., 2000a). Además, la reacción de dos cebadores adicionales como Loop B que se hibrida justo antes de iniciar la síntesis por desplazamiento (**estructura 14**) y Loop F (**estructura 15**) aceleran la reacción de LAMP (Nagamine et al., 2002)

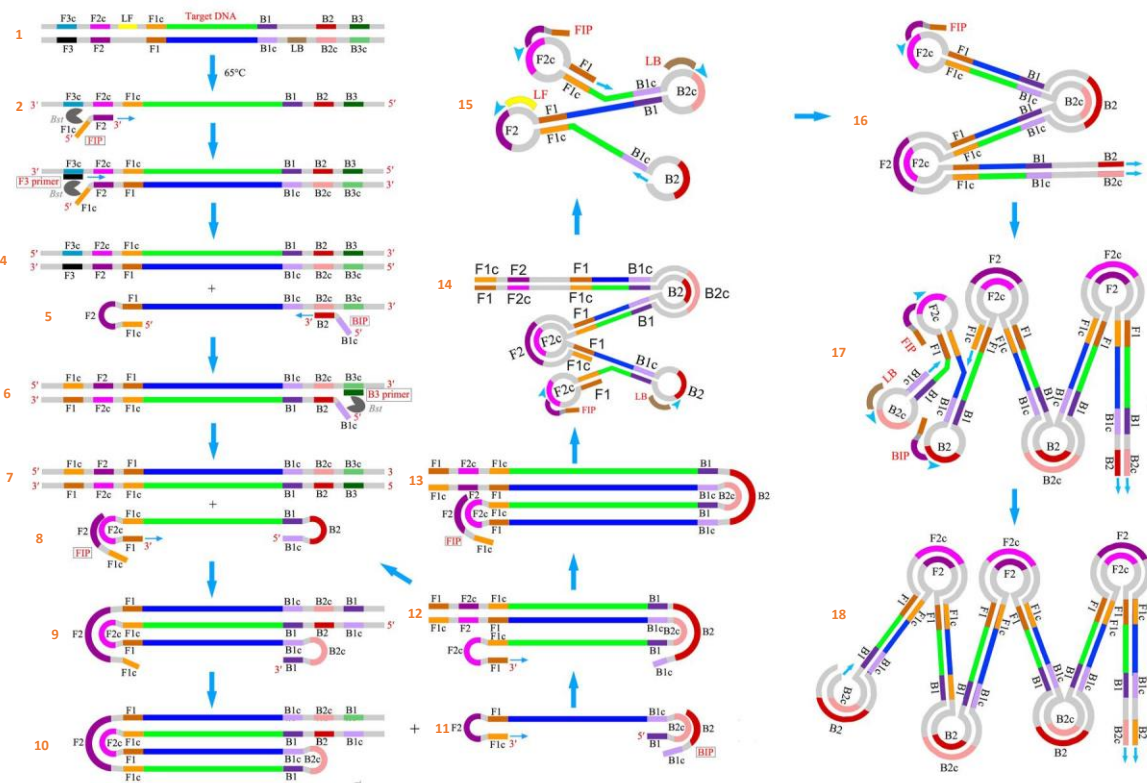


Figura 2. Esquema de amplificación isotérmica mediada por bucle. En el texto superior se describen los pasos incluidos dentro de la reacción. Tomado de (Li et al., (2016).

2 Justificación

Desde el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década de 1980, el campo de la biotecnología, la investigación básica, el diagnóstico clínico, agroindustrial y veterinario se han visto favorecidas con la utilización de esta potente herramienta que depende de las polimerasas y su capacidad para sintetizar cadenas de ADN o ARN con una alta fidelidad de copia. Generalmente las polimerasas pertenecientes a la familia A de bacterias termófilas y algunas de la familia B de arqueobacterias han sido caracterizadas para su utilización, no obstante, su finalidad en cada técnica va a depender de su termoestabilidad, tasa de extensión, procesividad, fidelidad, especificidad, capacidad de desplazamiento de cadena o capacidad de replicar nucleótidos modificados entre otras (Aschenbrenner & Marx, 2017). En este sentido, las polimerasas son clave dentro de las técnicas moleculares, lo que hace necesario que la caracterización de polimerasas sea una parte fundamental en los procesos de desarrollo de sistemas diagnósticos.

Por otra parte, con la aparición de la pandemia de SARS-CoV-2 la RT-qPCR se convirtió en la técnica más utilizada para su diagnóstico (Corman et al., 2020). No obstante, pese a su robustez, requiere de equipos costosos, personal altamente calificado que debe disponer de un tiempo relativamente largo para su resultado (Agustriana et al., 2023). Esto hace que la utilización de técnicas alternativas como LAMP, que requieren la aplicación de Pol Bst que posee actividad polimerasa, capacidad de desplazamiento de hebra, termoestabilidad (Kiefer et al., 1997a). capacidad innata de transcripción reversa (que reduce tiempo y riesgo de) (Shi et al., 2015), sea una alternativa, no solo para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (Kashir & Yaqinuddin, 2020) sino también de otras enfermedades (Bentaleb et al., 2016).

A pesar de los avances científicos en el desarrollo y comercialización de productos e insumos biotecnológicos y de diagnóstico, Colombia aún sigue dependiendo de otros países como principales proveedores. Es por tanto, que en la discusión abordada por la

misión de sabios de Colombia, se expresó que el país debía avanzar hacia la independencia en tecnología en salud, con el fin de evitar amenazas, especialmente en el suministro de productos para el control y vigilancia de enfermedades, enfatizando, en que esta amenaza traería consigo un derroche de recursos, que por el contrario podrían estar destinados a la prevención en salud, y que a su vez los resultados generados favorecen al desarrollo económico país (Ramírez et al., 2019).

Gracias a la experiencia del grupo de investigación Biotecnología Molecular de la Corporación CorpoGen, en la producción y comercialización reactivos requeridos en los procedimientos de biología molecular. Como se destaca la comercialización de Tucán Taq ADN polimerasa y su producción desde hace más de 15 años, tanto a escala de laboratorio y más reciente a nivel de biorreactor (Morales et al., 2022). Por otro lado, del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (Minciencias), a través de la financiación de iniciativas para la “generación de capacidades para la producción en Colombia de reactivos, insumos, y metodologías para la prevención, diagnóstico, tratamiento de enfermedades infecciosas, desatendidas y demás enfermedades transmisibles”, en asociación con la Universidad de los Andes y IMEX Colombia. Además del respaldo por parte del Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente (GERMINA) de la Universidad Nacional de Colombia, fue posible dar cumplimiento a los objetivos propuestos en este proyecto.

1 **3 Planteamiento del problema**

2 La pandemia de SARS-CoV-2 en diciembre del 2019 (Zhu et al., 2020), puso al descubierto
3 a Colombia en la dependencia tecnológica, en relación con la importación de insumos,
4 reactivos y equipos, que son de vital importancia para atender necesidades de salud
5 pública que demanda el país. Esta problemática que surge hace más de 50 años, evidencia
6 que el país dejó de producir recursos biotecnológicos que incluían vacunas contra la fiebre
7 amarilla, rabia, difteria, tétano entre otras, que incluso se exportaban a más de 20 países
8 de Centroamérica, Suramérica, el Caribe y África. Estas representaban una contribución
9 tanto nacional como internacional que lamentablemente se vieron interrumpidas y se
10 fueron debilitando con el tiempo, sumado a la crisis económica, se generó un debilitamiento
11 de infraestructura de los laboratorios y pérdida de certificados otorgados para su
12 fabricación (Minciencias, 2021).

13 La problemática anterior, hace que el país explore la capacidad científica y fortalezca la
14 infraestructura con el fin de promover la producción de recursos biotecnológicos, que
15 favorezcan primero una independencia y segundo a un desarrollo económico.

16 Por lo anterior, el presente trabajo pretende expresar una ADN polimerasa I de *Geobacillus*
17 *stearothermophilus* como recurso biotecnológico, para favorecer la producción de kits
18 diagnósticos moleculares para detección de enfermedades de importancia clínica en el
19 país.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Expresar y caracterizar funcionalmente una ADN polimerasa I de *Geobacillus stearothermophilus*.

4.2 Objetivos específicos

- Producir una enzima ADN polimerasa I mediante expresión heteróloga.
- Determinar la actividad enzimática de la ADN polimerasa I expresada.
- Determinar la funcionalidad de la ADN polimerasa expresada mediante reacción isotérmica.

5 Materiales y métodos

En este proyecto se realizó la expresión y caracterización funcional de una ADN Pol I Bst, a partir de un plásmido previamente clonado. El enfoque metodológico abarca diferentes etapas, iniciando por la secuenciación del plásmido mediante tecnología Oxford Nanopore (Kwok et al., 2014) seguido de análisis de secuencias y el procedimiento para el análisis *in silico*, con el propósito de determinar la estructura 3D y sitios activos de la proteína. Posteriormente se detalla la metodología de los objetivos planteados que incluyen la expresión, extracción, purificación, determinación de actividad catalítica y, finalmente, el análisis de funcionalidad utilizando como sustrato ARN de SARS-CoV-2.

5.1 Secuenciación de plásmidos.

5.2 Producción de proteínas por expresión heteróloga.

5.2.1 Sistema de expresión.

Se realizó la activación de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) criopreservado que contenía el gen que codifica para la proteína Pol Bst en agar LB con 100 µg/mL de ampicilina (Amp) y se incubó a 37 °C durante toda la noche. A partir de las colonias obtenidas se realizó un pase en un volumen de 3 ml de caldo LB con 100 µg/mL de Amp y se incubó en un agitador orbital (180 rpm) a 37 °C durante toda la noche (Rivera et al., 2020).

5.2.2 Expresión y extracción de proteínas.

Las células *E. coli* BL21 (DE3) que contenían el vector de expresión que codifican para el gen de la polimerasa, fueron cultivadas en un volumen de 10 ml de caldo LB con 100 µg/mL de Amp e incubadas en agitador orbital (220 rpm) a 37 °C por un máximo de 12 h. Del cultivo anterior, fue tomado un volumen en dilución 1:20 y llevado a caldo LB con 100 µg/mL de Amp e incubado a 37 °C en un agitador orbital (220 rpm), hasta alcanzar una

densidad óptica (DO_{600}) de 0,8. Posteriormente, fue inducida la expresión de la proteína polimerasa con una concentración final de 1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubada a 18 °C por 16 h en agitador orbital (220 rpm). Finalmente, fueron recuperadas las células por centrifugación a 3315 \times g. a 4 °C durante 20 min y almacenadas a -80 °C hasta su uso (Jackson et al., 2019).

Para la extracción de proteínas, se tomaron las células recuperadas en el paso anterior y fueron resuspendidas en solución de lisado de tampón casero de CorpoGen, se adicionó lisozima a una concentración de 0,1 mg/mL y se incubó en hielo por 1h. Posteriormente, se sonicó (sonicador Branson 450 Branson Ultrasonics Inc) a ráfagas de 10s, con una amplitud de 60, con 10s de pausa entre ráfagas (Saldanha et al., 1999). Por último, se clarificó el lisado en Microcentrifuga (Hermle Labortechnik Z216 MK) a 30.000 \times g por 20 min., y se recolectó el sobrenadante, se taró terminalmente durante 20 min a 60 °C, se centrifugó nuevamente a 30.000 \times g por 20 min, para finalmente almacenarlo a -80 °C hasta su uso.

5.2.3 Verificación de la expresión de proteínas mediante SDS-PAGE

Del sobrenadante obtenido en el paso de extracción, se tomó un volumen y se mezcló en dilución 1:1 con solución buffer Laemmli (SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004% y tris-HCl 125 mM). Posteriormente, se cargó en gel de poliacrilamida al 12% (acrilamida 40%, Tris pH 6,8 1,5 M, SDS 10%, APS 10% y TEMED), se agregó marcador de peso molecular de 250 kDa (NEB) y se analizó mediante cámara de electroforesis en solución buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1% y metanol al 20% pH 8,3), iniciando con transferencia a 50V \times 5 min, aumentando a 150V hasta transferencia completa (Bio-Rad Laboratories., 2012). Finalmente, se lavó con solución de fijado (50% metanol, 10% ácido acético glacial) durante toda la noche, se tiñó con solución de tinción de coomassie (0,1% azul de coomassie, 50% metanol y 10% ácido acético glacial) por 1h y decoloró con solución de desteñido (40% metanol y 10% ácido acético glacial). Por último, se almacenó en solución de conservado (5% ácido acético glacial).

5.2.4 Purificación de proteínas

La purificación de Pol Bst se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC). A partir del sobrenadante obtenido en el paso de extracción, se cargó en columna cromatografía de intercambio con 18 ml resina sefarosa (CYTIVA) (8 ml de columna empacada), se lavó con solución Tampón A bajo en sal (Tris-HCl, 50 mM pH 7,5 EDTA 0,1 mM, BME 10 mM, NaCl 100 mM). Posteriormente, se eluyó usando tampón A en gradiente lineal de NaCl desde la concentración de 100 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM y 1M. Las fracciones eluidas que contenían la proteína Pol Bst se confirmaron mediante SDS-PAGE, se combinaron y se dializaron en tampón bajo en sal. Las fracciones dializadas se cargaron nuevamente en columna de intercambio iónico con 18 ml de resina Sefarosa, se lavaron con tampón bajo en sal y se eluyeron con tampón A con NaCl desde la concentración de carga (100 mM) hasta la concentración de 600 mM. Las fracciones eluidas que contenían la proteína Pol Bst, se dializaron y concentraron usando un filtro de centrifuga Amicon 30 kDa (Millipore), y se confirmaron mediante SDS-PAGE (Jackson et al., 2019).

5.2.5 Cuantificación de proteínas por Método de Bradford

De la solución de proteína purificada, se realizaron diluciones seriadas [en solución tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, BME 10 mM, EDTA 1 mM y NaCl 100 mM) $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ y $\frac{1}{64}$], se agregó reactivo de Bradford e incubó a temperatura ambiente por 20 min. Paralelamente, se construyó una curva patrón en un rango de 320 a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con IgG a una concentración de 640 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se analizó en lector de microplacas (Tecan GENios) (Buger, 1994).

5.3 Determinación de la actividad enzimática

Para la evaluación de la actividad enzimática total de Pol Bst se realizó de acuerdo lo definido en el protocolo para el kit EvaEZ™ (Biotium), en una reacción de 20 μL (10 μL de mix EvaEZ™, 9 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de enzima) Inicialmente se calculó la tasa de cambio de fluorescencia, a partir de diluciones seriadas en base 10 (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) de la enzima purificada. Posteriormente se seleccionó la dilución con mejor respuesta lineal, seguido de una reacción independiente de la enzima saturada y un control sin enzima. Cada reacción se midió en un termociclador LightCycler® 96 durante

60 min utilizando el canal de detección SYBR Green. Finalmente, se calcularon las unidades catalíticas de Pol Bst a través de la siguiente formula:

$$Uc = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} * 270 \text{ pmol} \quad (1.1)$$

Donde:

- **Uc:** corresponde a las unidades catalíticas calculadas a partir de ΔF y ΔF_{max} .
- **ΔF :** corresponde a la pendiente (unidades de fluorescencia/minuto) por 60 minutos.
- **ΔF_{max} :** corresponde al cambio de tasa de fluorescencia entre el minuto 60 de la enzima saturada y la fluorescencia del minuto 60 del control sin enzima o blanco.
- **270 pmol:** Es el número de nucleótidos sintetizados en una reacción EvaEZ de 20uL con enzima saturada.

La actividad especifica se calculó mediante la siguiente formula:

$$Ae = \frac{AE}{Pt} \quad (1.2)$$

- Donde:
- **Ae:** actividad especifica
- **AE=** corresponde a la actividad enzimática calculada a partir de la fórmula 1.1.
- **Pt** = proteína total calculada por método Bradford.

5.4 Determinación de funcionalidad

El ensayo de funcionalidad de Pol Bst se llevó a cabo mediante la técnica molecular LAMP(Notomi et al., 2000b) en una reacción de 25 μ L que contenía: solución buffer 10X (Tris HCL 20mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 mM, KCL 50mM, MgSO_4 2 mM y Tween-20 0.1% v/v), una mezcla de cebadores 10X previamente preparados (**Tabla 2**) con una concentración final descrita por (Tanner & Evans, 2013)(FIP/BIP 1,6 μ M, F3/B3 0,2 μ M, LoopF/B 0,4 μ M), MgCl 3 mM, dNTPs 1,4 mM, DTT (ditiotretitol) 10mM, 5 μ L de ARN de SARS-CoV-2 (previamente incubado a 70 °C por 5 min) y 1 μ L de enzima Pol Bst purificada. Como control positivo de reacción se utilizó el kit comercial *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Máster Mix*. Para ambas reacciones se adicionó agua destilada estéril libre de nucleasas,

hasta completar el volumen. La reacción se incubó a 65 °C por 60 min, con paso un adicional de inactivación de la enzima a 85 °C por 5 min. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se verificó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100V por 1 hora. El gel se tiñó con SYBR Safe Invitrogen.

Tabla 2. Secuencia de cebadores LAMP para la detección SARS CoV-2. Reportado por (Rabe & Cepko, 2020).

Primer	[] inicial 10X	Secuencia de cebadores dirigidos al gen Orf1a de SARS CoV-2
F3	2 µM	5'-CGGTGGACAAATTGTCAC-3'
B3	2 µM	5'-CTTCTCTGGATTTAACACACTT-3'
FIP	16 µM	5'-TCAGCACACAAAGCCAAAAATTTATTTTCTGTGCAAAGGAAATTAAGGAG-3'
FIB	16 µM	5'-ATTGGTGGAGCTAAACTTAAAGCCTTTTCTGTACAATCCCTTTGAGTG-3'
Loop F	4 µM	5'-TTACAAGCTTAAAGAATGTCTGAACACT-3'
Loop B	4 µM	5'-TTGAATTTAGGTGAAACATTTGTCACG-3'

6 Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados de la expresión y caracterización funcional de una Pol Bst de *G. stearothermophilus*. Partiendo de la secuenciación del gen que codifica para la proteína, seguido del análisis *in silico*, expresión y purificación, determinación de actividad catalítica y, por último, el ensayo funcional basado en la técnica LAMP con el fin de detectar ARN de SARS-CoV-2.

6.1 Secuenciación de plásmido y análisis de secuencia

El plásmido que contiene la región codificante para Pol Bst, se secuenció por tecnología Oxford Nanopore con el fin de confirmar el gen que codifica para ADN Pol I Bst. Después del análisis bioinformático y respectiva anotación por pLannotate (McGuffie & Barrick, 2021) y visualización en SnapGene 7.1.0, se pudo evidenciar una secuencia (incluyendo la del plásmido) de 6845 pb (**Anexo 1**) y, al realizar la ubicación del gen dentro del plásmido se extrajo una región con un tamaño de 1677 pb (**Anexo 2**) el cual se analizó en BLASTn. Los resultados de este gen reflejan una identidad del 99.72% y una cobertura del 100%, que confirma la gran similitud con una región del genoma completo de *G. stearothermophilus* (GenBank CP008934.1). Una vez determinada la similitud entre la secuencia de nucleótidos, se procedió a realizar el análisis en BLASTx para comprobar la hebra codificante de aminoácidos. Los resultados confirman una secuencia de longitud de 576 aminoácidos, con una identidad del 99,48% y una cobertura del 99% para una ADN Pol I Bst. Teniendo en cuenta que el gen completo de ADN Pol I Bst corresponde a 2850 pb y codifica una proteína de 876 aminoácidos que posee III dominios: exonucleasa 3-5' y 5-3' y de síntesis de ADN (Phang et al., 1995) y que el fragmento grande derivado del extremo C-terminal posee un tamaño de gen de 1776 pb que codifica 592 aminoácidos, el cual solo contiene II dominios exonucleasa 3'-5' y de síntesis de ADN (Kiefer et al., 1997^a), confirma que el gen clonado para este estudio corresponde a la secuencia del fragmento grande de Pol Bst.

6.2 Análisis *in silico* para la determinación de la estructura 3D y sitio catalítico de Pol Bst

6.2.1 Alineación de secuencia basada en la estructura

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de la secuencia, se observó que la secuencia de aminoácidos tenía una similitud del 99,48% y aunque el resultado conserva un valor con alta identidad, se realizó un alineamiento múltiple para verificar en qué residuos de aminoácidos existían diferencias. Para ello, se tomaron secuencias de aminoácidos almacenadas en PDB (4B9L, 2XY5, 2XY7, 2XO7, GMU4, 4UQG, 2XY6, 6DSU) correspondientes a ADN Pol I Bst que compartieran una identidad mayor al 93%. Los resultados muestran secuencias altamente conservadas entre sí a partir del residuo Phe 300 (**Figura 3**). No obstante, se observa una sustitución de Tyr550(T) en la secuencia de Pol Bst, 6DSU y 6MU4, por Ser550(S) respecto a las secuencias 2XY6, 4UQG, 4B9L, 2XY7, 2XO7 y 2XY5; a esta sustitución se le asigna una puntuación de -2 en la matriz de BLOSUM62. Se identifica, además, una sustitución en la secuencia Pol Bst en la posición 742; de Ser(S) por Asn(N) y en la posición 876; de Lys(K) por Glu; asignando una puntuación de +1 para la primera y -2 para la segunda. Los cambios evidenciados se representan como sustituciones similares entre aminoácidos ya que, sustituciones negativas son menos comunes y conservadas y, aunque sustituciones positivas como la observada en la posición 876 son más comunes y conservadas, tendría que asignarse una puntuación mayor o igual a 4 en la matriz de BLOSUM62 que corresponde a una coincidencia idéntica entre aminoácidos (Henikoff & Henikoff, 1992).

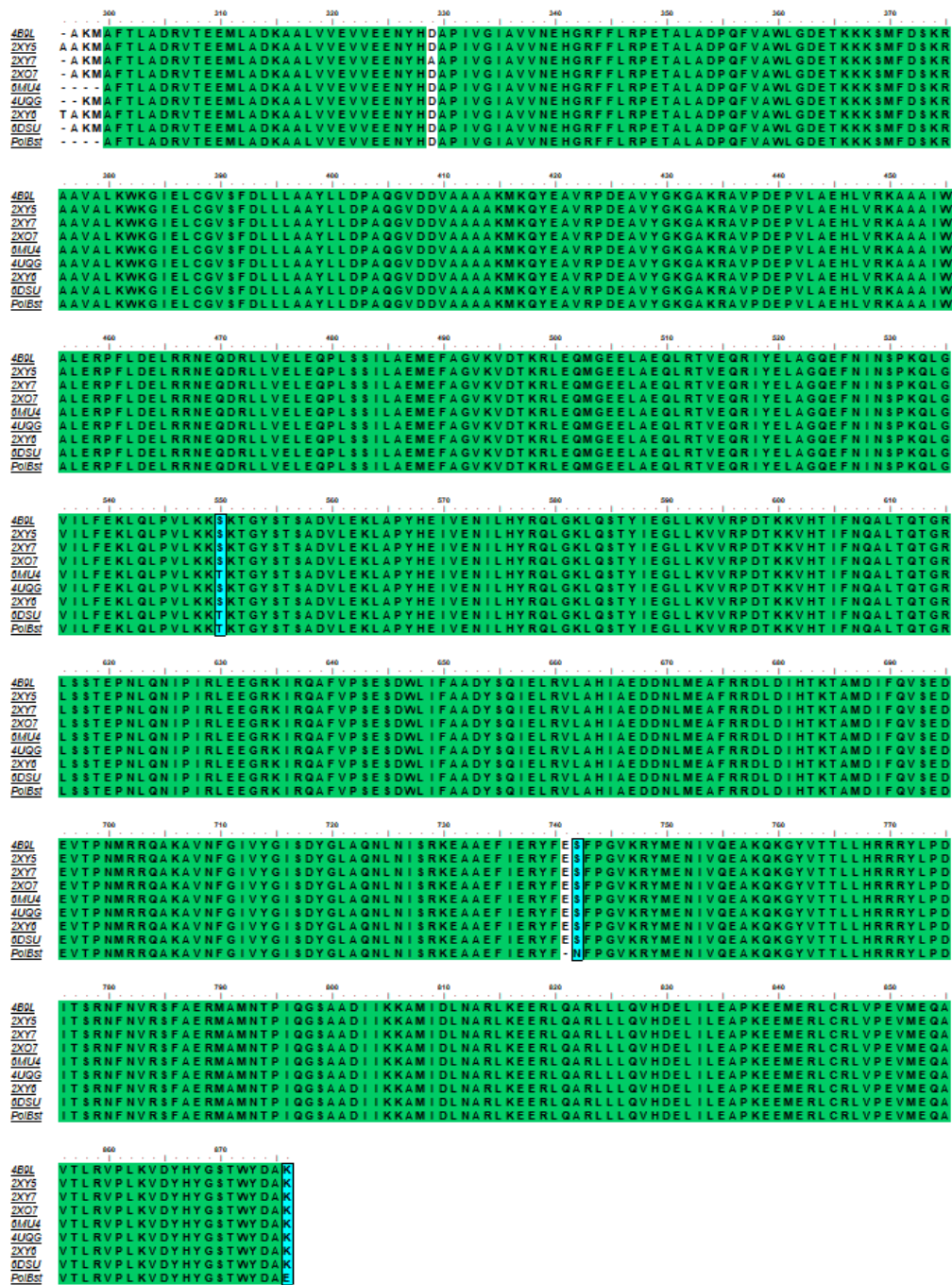


Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de ADN Pol I Bst con Pol Bst. Secuencias que presentan sombreado verde son idénticas, secuencias en sombreado azul son similares y secuencias que no comparten similitud están sombreadas en blanco.

Una vez realizado el alineamiento múltiple de las secuencias y analizado las sustituciones y deleciones presentadas, se pretendió confirmar si estas discrepancias estaban directamente relacionadas al sitio activo de la proteína. Para ello, se inició realizando la construcción del modelo tridimensional (3D), seguido de la comparación de estructuras y, por último, la determinación del sitio activo como se muestra a continuación:

6.2.2 Determinación de la estructura 3D de Pol Bst

La construcción del modelo de Pol Bst se realizó utilizando SWISS-MODEL (Schwede et al., 2003), arrojando una estructura (**Figura 4A**) con una identidad del 99,48% [la misma evidenciada en el análisis en Blastx (**sección 9.1**)] en relación con la secuencia 4B9L almacenada en PDB (**Figura 4B**). A partir de este modelo obtenido, se realizó una comparación por pares y alineación 3D entre Pol Bst y 4B9L utilizando PDBeFold, evidenciando que se conserva la estructura predicha la cual se asemeja a una mano derecha con sus respectivos subdominios: dedos, palma, pulgar, que se ubican entre los residuos 469-876, y el dominio exonucleasa 3'-5' N-terminal, que se ubica entre los residuos 362-468 (**Figura 4C**) (Kiefer et al., 1997a; Ocorbin & Filipenko, 2023a).

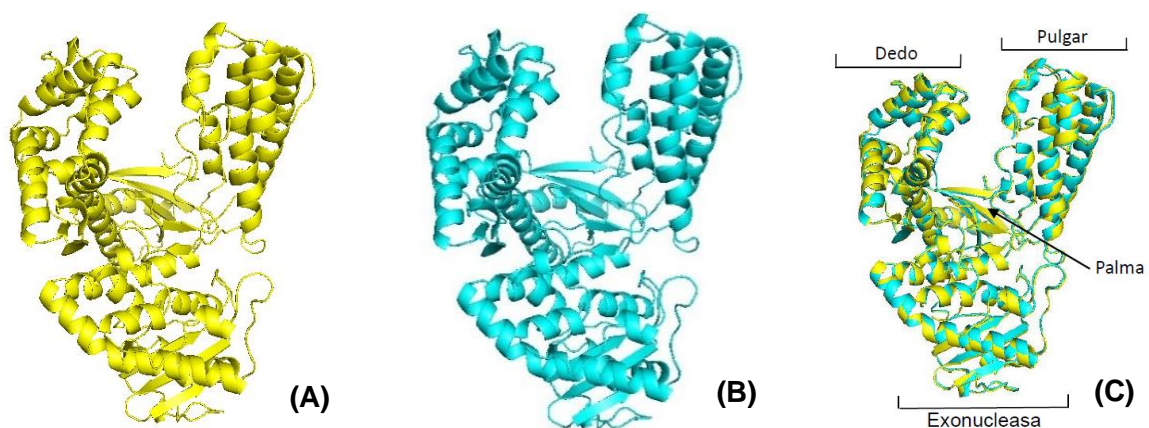


Figura 4. Alineamiento de la estructura 3D entre Pol Bst y 4B9L. (A). Estructura 3D Pol Bst. **(B).** Estructura 3D 4B9L **(C).** Superposición de Pol Bst (amarillo) y 4B9L (azul). Visualizadas en PyMOL (Schrödinger, 2020).

6.2.3 Determinación del sitio catalítico de Pol Bst

Para comprobar si las sustituciones o brechas evidenciadas durante el alineamiento múltiple (**Figura 3**) tenían relación al sitio activo de la proteína, se identificaron cada uno de los residuos a través de PyMOL (Schrödinger, 2020) (**Figura 5**), tomando como referencia el mapa de interacción de una estructura n+1 obtenida en catálisis cristalina (Chim et al., 2018). Los resultados demuestran que los residuos sustituidos en la secuencia Pol Bst no corresponden al sitio activo de la enzima.

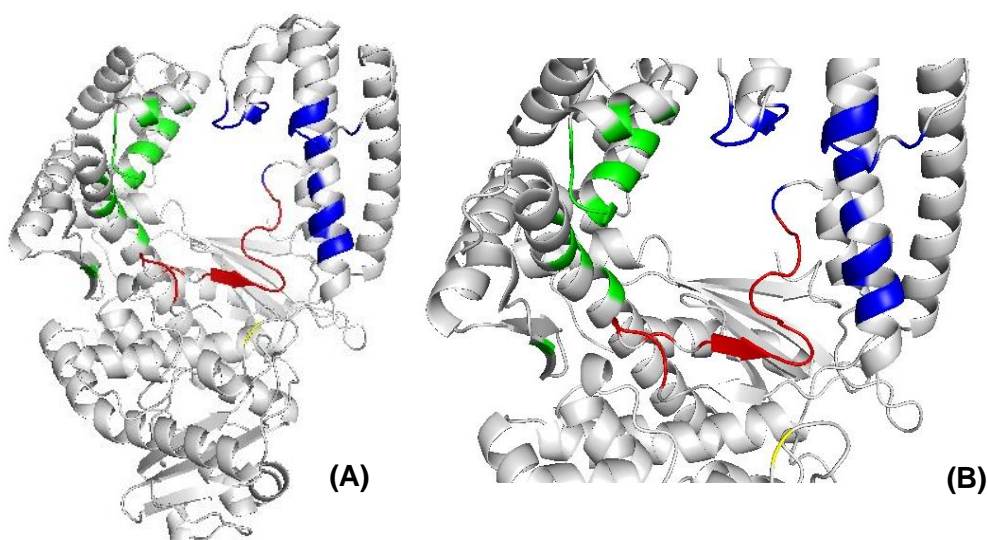


Figura 5. Determinación del sitio catalítico de Pol Bst. (A). Arquitectura global de Bst Pol que muestran las regiones del sitio activo. **(B).** Región del sitio activo de Pol Bst. Sitio palma en rojo, sitio pulgar en azul, sitio dedo en verde. Sitio exonucleasa 3'-5' en amarillo.

6.3 Resultados del primer objetivo: “Producir una enzima ADN polimerasa I mediante expresión heteróloga”

6.3.1 Expresión de Pol Bst

Una vez confirmada que la secuencia corresponde a una Pol Bst y que el análisis *in silico* demuestra que no se observan deleciones o sustituciones que pudieran afectar el sitio activo de la proteína, se procedió a realizar la respectiva expresión y purificación de la proteína.

Los resultados iniciales permitieron determinar la expresión de Pol Bst al inducir con IPTG al 1 mM (**Figura 6 Carril 2**), lo que concuerda con lo obtenido por Agustriana et al., (2023). Una vez confirmada la expresión, se observó que el control no inducido estaba exhibiendo una expresión basal (**Figura 6 Carril 1**). Esto podría estar influenciado por la presencia de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y una proteína receptora llamada CAP, que en conjunto forman un complejo CAP/AMPc aguas arriba del promotor, estimulando directamente la afinidad de la ARN polimerasa al promotor y, por ende, iniciar el proceso de transcripción de ARN, aún sin el inductor presente (Robert Novy and Barbara Morri, 2003).

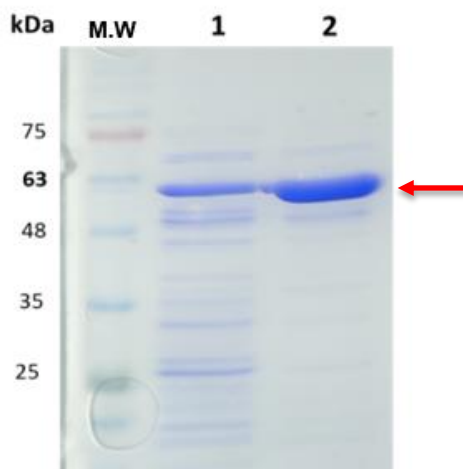


Figura 6. La proteína Pol Bst se expresa cuando se induce con IPTG al 1 mM. Verificación de la expresión de Pol Bst. Carril 1: No inducido. Carril 2 y flecha roja: inducido con IPTG al 1 mM y Pol Bst. SDS-PAGE 12%. M.W: marcador de peso molecular 11-250 kDa (Opti.Protein XL Marker R-G266) Teñido con Coomassie R-250.

Por lo anterior, se procedió a verificar si la adición de glucosa 1% al preinóculo tenía algún efecto en la reducción de la expresión. Los resultados determinan que, en efecto, la expresión basal es reprimida como se observa en el carril 3 y 4 (**Figura 7**). Esto verifica lo reportado por Robert Novy and Barbara Morri (2003). Esta represión se debe principalmente a que la inducción de la transcripción depende de los niveles de AMPc presente en la célula, y por la adición de glucosa al 1% estos niveles se ven disminuidos reduciendo la afinidad de la ARN polimerasa al promotor y, por ende, la expresión de Pol Bst durante fases estacionarias generadas en el crecimiento del preinóculo, lo que se conoce como represión catabólica (Robert Novy and Barbara Morri, 2003).

Adicionalmente, se pretendió comprobar, para efectos de purificación, si la adición de lisozima era necesaria durante la lisis celular o solo bastaba con utilizar una lisis inducida por sonicación, y cómo esto se relacionaba a la recuperación de proteína. Para llevar a cabo este experimento, se utilizó el protocolo de lisis como se describe en la metodología (**sección 8.2.3**). En la **Figura 7**, se muestran los resultados de la lisis con adición de lisozima (carriles 1 y 3) y sin adición de lisozima (los carriles 2 y 4), observándose una banda en mayor proporción (triángulo negro **Figura 7**) cuando se adiciona lisozima durante la lisis. Esto se sustenta en que la lisozima que forma parte de las hidrolasas glucosídicas cataliza la hidrólisis del enlace $\beta(1-4)$, entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico de las paredes celulares de las bacterias (Jana et al., 2017), lo que favorece la ruptura y liberación de mayor cantidad de la proteína de interés; esto, en términos de rendimiento sería fundamental. Sin embargo, es necesario realizar experimentos que comparen las variables definidas en términos cuantificables de rendimiento y si las modificaciones en los ciclos de sonicación se relacionarían e igualarían a cuando se combina lisozima con sonicación.

Finalmente, se confirmó el peso molecular de Pol Bst utilizando Image Lab (Bio-Rad). Los resultados arrojan un peso molecular de 61,8 kDa, que corresponde a 576 aminoácidos (**Anexo C**), observándose una diferencia de 16 residuos, que podrían explicar la disminución de su peso respecto a lo reportado por Kiefer et al (1997), de 67,7 kDa con un tamaño de secuencia de 592 aminoácidos. La falta de estos residuos estaría ligada a la secuencia N-terminal de la proteína como se observa en el alineamiento múltiple (**Figura 3**). Pero no afectaría los dominios importantes de la proteína, pues la secuencia faltante

estaría ligada al dominio exonucleasa 5'-3' el cual no pertenece al fragmento grande de Pol Bst. (Oscorbin & Filipenko, 2023^a).

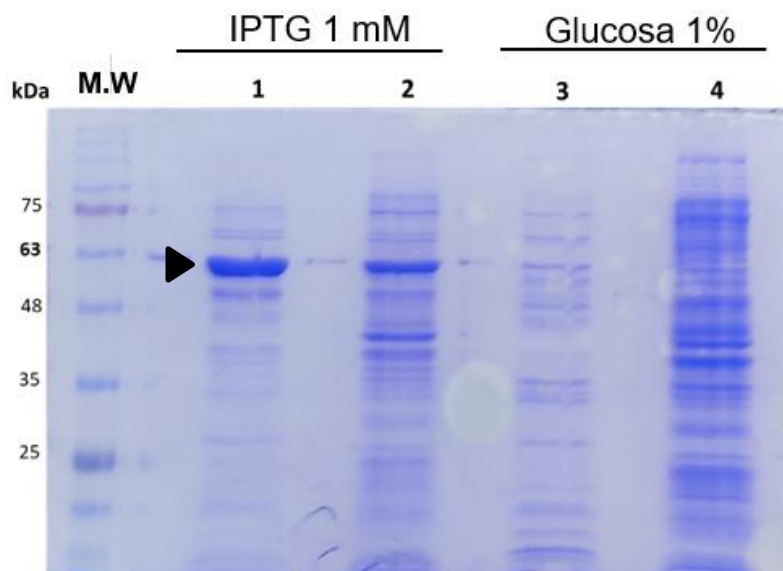


Figura 7. La adición de glucosa reprime la expresión basal de la Pol Bst. Carriles 1 y 2: inducción con IPTG al 1 mM. Carriles 3 y 4 control no inducido con adición de glucosa al 1% al preinóculo. Carril 1 y 3: adición de lizozima. Carril 2 y 4 sin adición de lizozima. M.W: marcador de peso molecular 11-250 kDa (Opti.Protein XL Marker R-G266). SDS-PAGE 12%. Teñido con Coomassie R-250.

6.3.2 Purificación de Pol Bst por cromatografía de intercambio iónico (IEC)

Ya confirmado que la proteína Pol Bst se había expresado satisfactoriamente, se llevó a cabo la purificación mediante IEC. En los resultados de la primera IEC se observa que la elución de Pol Bst se obtuvo cuando se utilizó tampón A que contenía NaCl de 400 y 600 mM (**Figura 8 A; carril 3 y 4**). Sin embargo, en este punto seguían presentándose contaminantes proteicos. Por esta razón, se procedió a realizar una segunda IEC con el fin de purificar aún más a Pol Bst. Para ello se mezclaron las fracciones eluidas en 400 y 600 mM, se dializaron con tampón A bajo en sal y se eluyeron solo hasta concentraciones

de NaCl de 600 mM, (no se tuvieron en cuenta gradientes de elución de 800 mM y 1 M, dado a que el punto de elución de Pol Bst fue 600 mM). Los resultados (**Figura 8 B carril 5-8**) confirman lo obtenido en la primera purificación con un punto de elución de 400 mM y 600 mM, observándose una mayor fracción obtenida de Pol Bst en el carril 6. Además, se obtiene una proteína más pura en relación con la primera cromatografía realizada pues se observan menos bandas no correspondientes al peso molecular de Pol Bst.

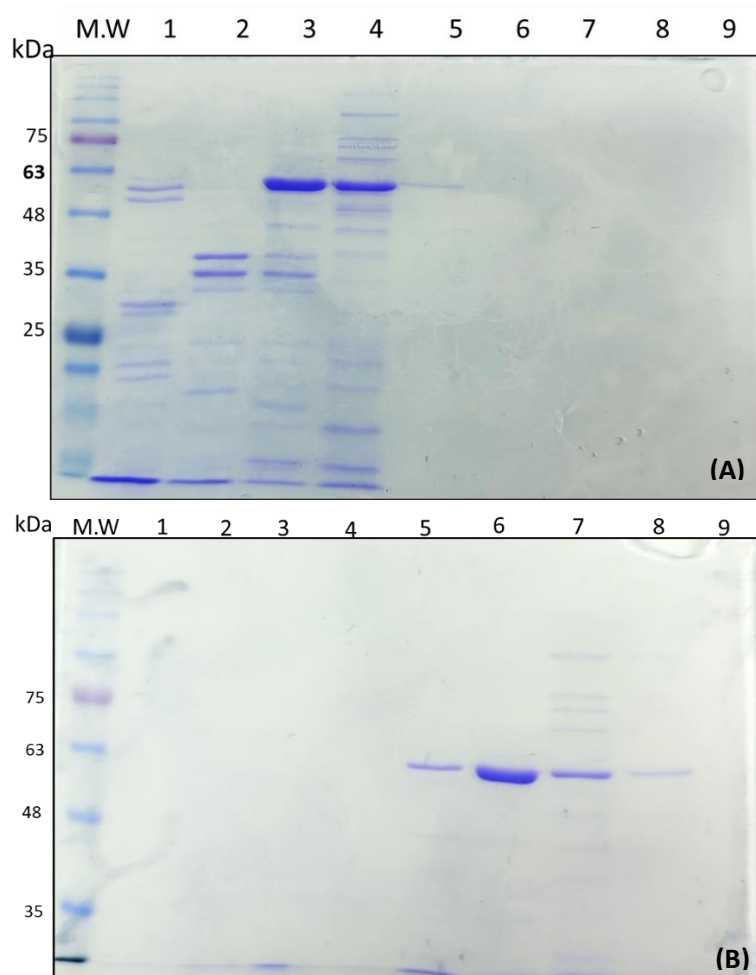


Figura 8. Cromatografía de intercambio iónico (en inglés IEC) (A). Gradiente de elución de Pol Bst - primera purificación: Carril 1: 100 mM; Carril 2: 200 mM; Carril 3: 400 mM; Carril 4: 600 mM; Carril 5: 800 mM; y Carril 6: 1000 mM. **(B).** Gradiente de elución de Pol Bst - segunda purificación: Carriles 1 y 2: 100mM; Carriles 3 y 4: 200 mM; Carriles 5 y 6: 400 mM; Carriles 7 y 8: 600 mM; y Carril 9: no retenido. M.W: marcador de peso molecular 11-250 kDa (Opti.Protein XL Marker R-G266). SDS-PAGE 12%. Teñido con Coomassie R-250.

Una vez realizada la segunda purificación de la proteína mediante IEC, se procedió a dializar con tampón A bajo en sal, y a concentrar utilizando Amicon®Ultracel-30. La fracción de Pol Bst purificada/concentrada, se verificó mediante SDS-PAGE (**Figura 9**) y, finalmente, se cuantificó a partir de una curva de calibración (**Anexo D**), obteniendo un resultado de 2 mg/ml de proteína total.

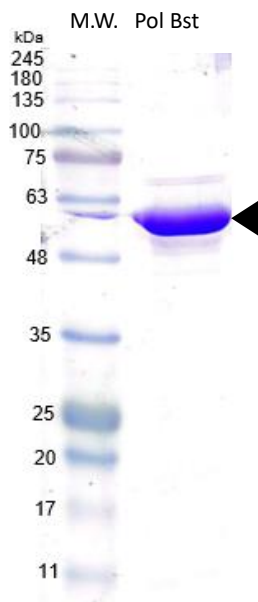


Figura 9. Concentración de proteína total Pol Bst. se utilizó Amicon®Ultracel-30 R-UFC903024. M.W: marcador de peso molecular 11-250 kDa (Opti.Protein XL Marker R-G266).

6.4 Resultados objetivo 2: “Determinar la actividad enzimática de la ADN polimerasa I expresada”

A partir de la proteína purificada/concentrada se procedió a calcular la actividad enzimática de Pol Bst. Para ello se determinó inicialmente la tasa de recambio de fluorescencia resultante de la actividad de la polimerasa que está representada por la pendiente que, en términos generales, es la medida de la velocidad inicial de una enzima durante las primeras etapas de reacción en donde la conversión de sustrato a producto es aún muy pequeña, por lo que cualquier efecto inhibitorio del producto sobre la enzima es insignificante, lo cual hace que la enzima permanezca estable (Marangoni, 2003). Para llevar a cabo este paso inicial se realizaron diluciones seriadas en base 10 (**Figura 10**), y una vez finalizada la reacción, se calculó la pendiente mediante el modelo de regresión lineal seleccionando así la dilución 1/1000 (**Figura 11**) que aportó una mejor pendiente con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9873$.

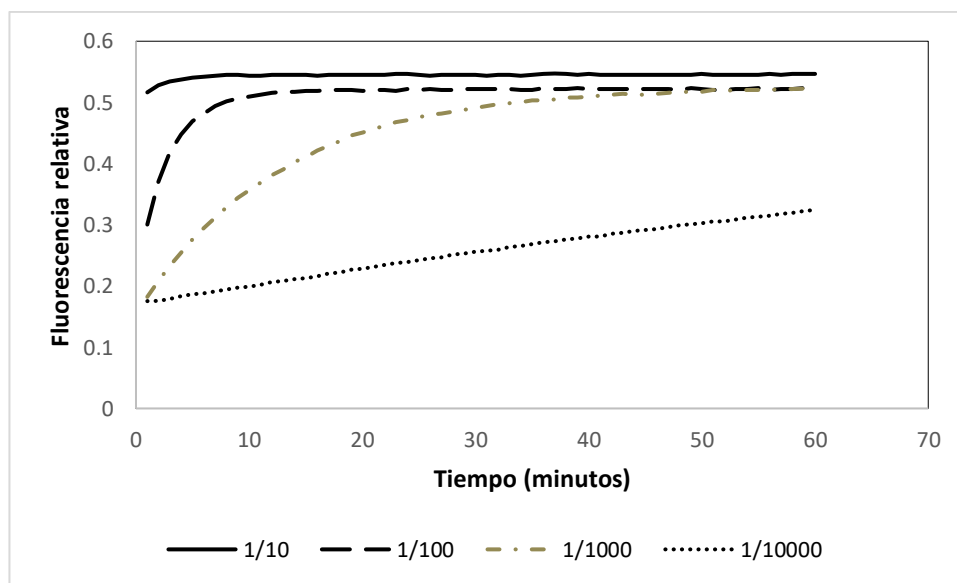


Figura 10. Diluciones seriadas para la determinación de la velocidad inicial de Pol Bst. Cada línea representa las diluciones seriadas en base 10 de la enzima.

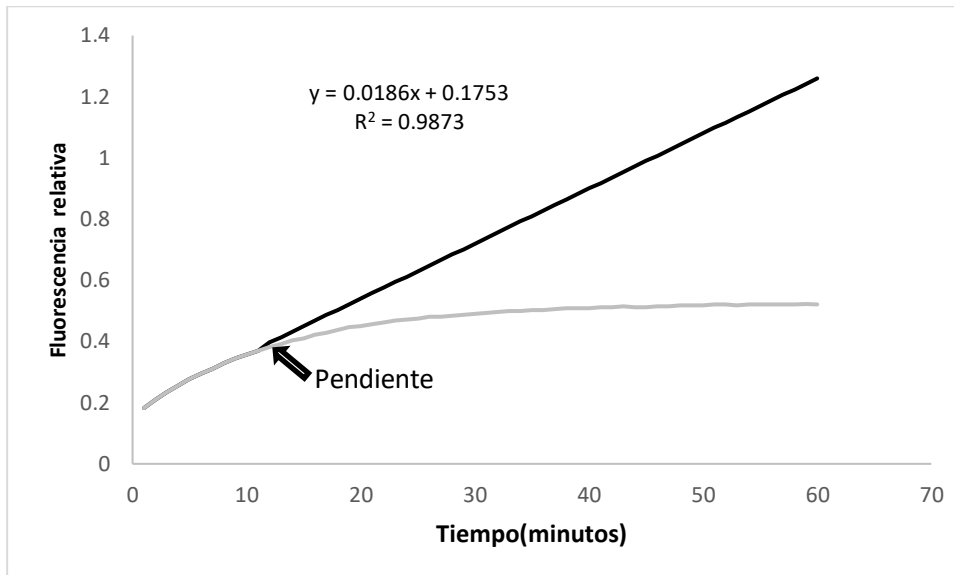


Figura 11. Determinación de la velocidad inicial (unidad de fluorescencia/minuto) de Pol Bst. La línea gris representa la actividad de Pol Bst en función al tiempo. La línea negra representa la línea de tendencia. La flecha negra indica la pendiente.

Ya calculada la velocidad inicial de la Pol Bst, se procedió a determinar la actividad enzimática, siguiendo la fórmula 1.1 (sección 8.4). Los resultados obtenidos, como que se presentan en la **Figura 12** y la **Tabla 3**, revelan una actividad enzimática superior lo reportado por Agustriana et al. (2023) de 480 U y de 274.49 U obtenido por Rastgoo et al., (2009), lo que confirma una actividad considerablemente mejor para la Pol Bst obtenida en este estudio.

Posteriormente se realizó la determinación de la actividad específica como se describe en la fórmula 1.2 (sección 8.4), la cual se presenta en unidades de actividad U, por mg de proteína, donde una unidad enzimática se define como la incorporación de 270 pmoles de dNTPs en 60 min. Los resultados de la actividad especifican de Pol Bst (**Tabla 4**), se comparan con los hallazgos previamente reportados por de Kiefer et al., (1997) y Ocorbin & Filipenko, (2023), con valores de $1,5 \times 10^5$ U/mg, $4,9 \times 10^5$ y $0,82 \times 10^5$ U/mg, lo que demuestra que la Pol Bst presenta una buena actividad específica.

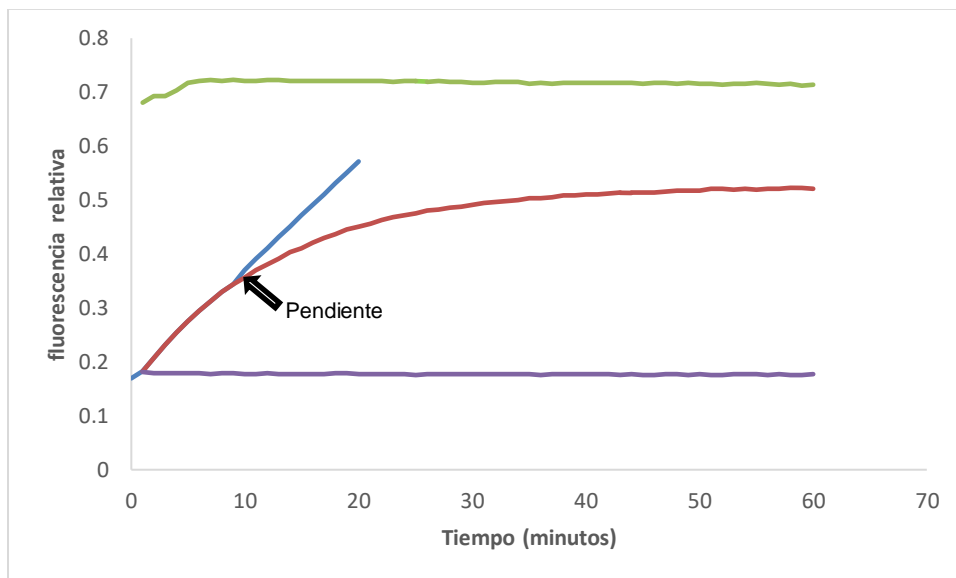


Figura 12. Determinación de la actividad enzimática en función del número de nucleótidos sintetizados. Línea verde: tasa de cambio de fluorescencia de Pol Bst saturada. Línea roja: tasa de cambio de fluorescencia dilución 1/1000 de Pol Bst. Línea azul: línea de tendencia. Línea morada: control de sin enzima Pol Bst. ΔF : corresponde a la pendiente (unidad de fluorescencia/minuto) por 60 min. ΔF_{\max} : corresponde al cambio de tasa de fluorescencia entre el minuto 60 de la enzima saturada y la fluorescencia del minuto 60 del control sin enzima o blanco.

Tabla 3. Determinación de la actividad enzimática de Pol Bst.

Definición	Resultado
ΔF_{\max}	0.536969
ΔF	1.206
$\Delta F/F\Delta_{\max} \cdot 270$	606.4 U

Tabla 4. Determinación de la actividad específica de Pol Bst.

Proteína total (mg/ml)	Actividad enzimática total (U)	Actividad específica (U/mg)
0.002	606.4	3.0×10^5

6.5 Resultado objetivo 3: “Determinar la funcionalidad de la ADN polimerasa expresada mediante reacción isotérmica”

Finalmente, tras una búsqueda en BLASTn y elegido el conjunto de búsqueda secuencia de patentes (pat), se observó un porcentaje de identidad del 99.72% para la “*Sequence 1 from patent US 5830714*”. Al verificar el acceso en LENS.ORG se observa que la secuencia que pertenece al “Fragmento biológicamente activo de la ADN polimerasa del *bacilo stearothermophilus*” presenta patentes expiradas y no tiene ningún mecanismo de protección activo que impida su uso (**Anexo D**). Lo que permite la libertad de operación para aplicación de sistemas diagnósticos con fines investigativos o comerciales.

7 Conclusiones

En este trabajo se logró expresar y purificar una ADN polimerasa I que pertenece al fragmento grande de Bst. Contiene un gen 1677 pb que codifica para 576 aminoácidos con un peso molecular menor a lo reportado, que estaría ligado a un faltante del al extremo N-terminal (exonucleasa 5'-3') que no representa un domino catalítico importante de la enzima. Posee actividad tanto enzimática como específica favorable que se compara con la obtenida en otros estudios. Conserva actividad retrotranscriptasa y polimerasa al amplificar ARN de SARS- CoV-2 mediante reacción isotérmica, lo que comprueba que es una enzima biológicamente activa. Finalmente, se comprueba que no posee ninguna restricción en cuanto a su uso por patentes por lo que posee libertad de operación, lo que posibilita la producción como un insumo importante para el desarrollo de sistemas diagnósticos para el control de enfermedades de importancia clínica, agropecuaria y veterinaria lo que contribuiría al inicio de una independencia biotecnológica en el país.

7.1 Recomendaciones

Para investigaciones futuras podrían considerarse las siguientes recomendaciones:

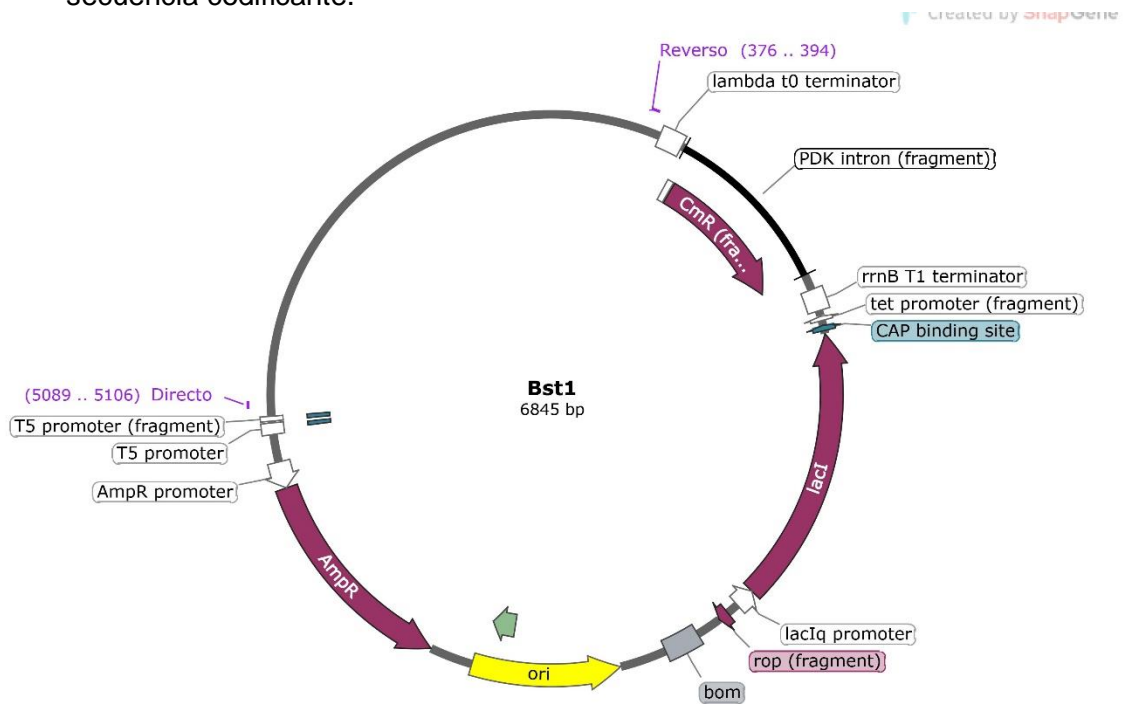
Realizar procesos de optimización de la expresión y purificación de la enzima tanto a escala de laboratorio como en nivel de biorreactor y cuantificar su rendimiento en cada una de sus fases.

Realizar la optimización de las condiciones de reacción a través de la modificación de variables influyen en su actividad enzimática.

Realizar estudios que establezcan los costos de producción de la enzima

A. Anexo A: Anotación de plásmidos de Pol Bst

- A. Secuencia del del plasmido anotada por software plannotate (McGuffie & Barrick, 2021). Las letras moradas los primer utilizados para identificar la región de la secuencia codificante.



B. Anexo B: secuencia codificante y codificada de Pol Bst

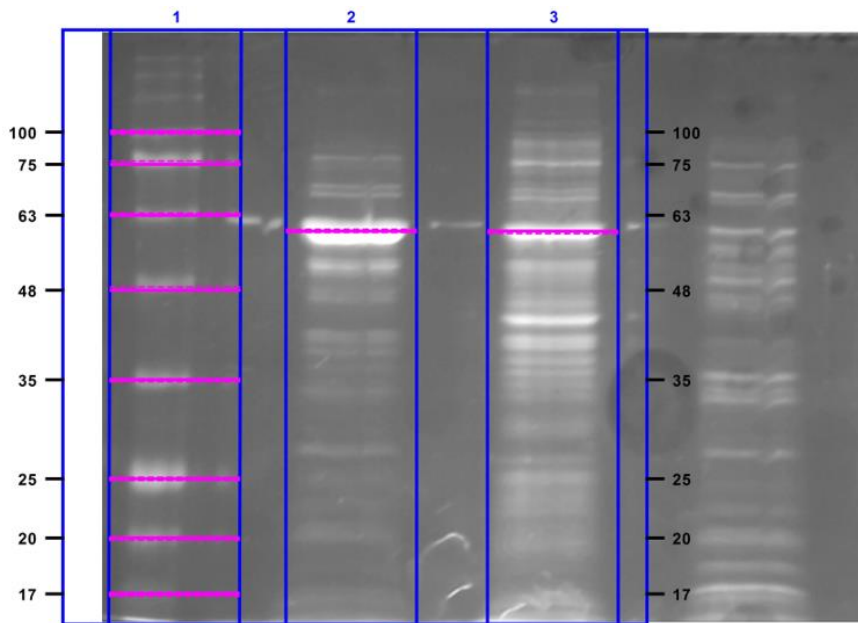
>GenPolBst

```
CTCATTATTTTCGCATCATACCACGTGCGAGCCATAATGGTAATCGACTTTGAGCGGCACGCGAA
GTGTGACCGCTTGCTCCATCACTTCCGGAACGAGCCGGCACAGCCGCTCCATCTTCTTTTC
GGCGCCTCCAAAATGAGCTCGTCATGCACCTGCAGCAAAAGGCGCGCTTGCAGCCGCTCTTC
CTTCAGTCTGGCGTTTCAGATCGATCATCGCCTTTTTAATAATGTCAGCGGTGCGGCTCGTGAT
ATCCGGCAAATAGCGGCGCCGATGCAGCAGCGTCGTACATACCCTTTCTGTTTTGCTTCTTG
CACAATGTTTTCCATATACCGCTTCACGCCAGGGAAGTTGAAGTAGCGCTCGATGAATTCAGC
CGCCTCTTTGCGCGAAAATTTAAGTTTTGCGCCAAGCCGTAATCACTGATCCCGTAAACGAT
CCCAAAGTTGACCGCCTTCGCCTGACGGCGCATGTTGGGCGTCACTTCGTCCTCGCTCACTT
GGAAAATGTCCATCGCTGTTTTCGTATGGATATCCAAATCGCGGCGGAACGCTTCCATTAAT
TGTCATCTTCCGCAATATGGGCGAGGACGCGCAACTCAATTTGCGAGTAGTCGGCGGCGAAA
ATGAGCCAATCAGACTCCGATGGCACGAACGCTTGGCGGATTTTCCGTCTTCTCAAGCCG
AATCGGAATGTTTTGCAAGTTCGGCTCCGTGAGCTGAGCCGTCCGGTTTTCGTCAACGCCT
GATTGAAAATCGTATGCACCTTCTTTGTATCGGGTCGCACGACTTTCAGCAATCCTTCAATATA
CGTCGACTGCAACTTGCCAAGCTGGCGGTAATGCAAAATGTTTTCCACGATCTCGTGATAAGG
CGCAAGTTTTTCAAGCACATCCGCCGAAGTGGAGTAGCCGGTTTTCGTTTTTTTCAAGACGGG
CAGCTGCAGTTTTTCAAATAAAATGACGCCGAGCTGTTTCGGTGAATTGATGTTGAATTCTTGG
CCGGCGAGCTCATAAATGCGCTGCTCGACCGTGCGCAGCTGCTCGGCGAGCTCTTCGCCCA
TCTGTTTCGAGCCGCTTCGTATCCACTTTCCTCCGGCAAATTCATTTCCGCCAAAATCGAAG
ACAACGGCTGCTCGAGCTCGACGAGCAACCGATCTTGTTCGTTGCGGCGCAGCTCATCCAAA
AACGGCCGTTTCGAGCGCCCAAATCGCCGCCGCTTTCGGACCAAATGCTCGGCGAGCACTG
GCTCATCCGGCACGGCCCGCTTCGCCCTTTGCCATACACCGCTTCATCCGGGCGCACCCGC
TTCGTATTGCTTCATTTTTGCTGCGGCAGCCACATCATCAACACCTTTCGCGCCGGATCAAGCAA
ATAGGCGGCCAGCAATAAATCAAAGGAAACGCCGCATAGCTCAATTCCTTTCCATTTCAAGGC
GACTGCCGCGCGCTTTGAGTCAAACATGCTTTTTTCTTCGTTTCATCACCAAGCCAGGCGACA
AACTGCGGATCGGCAAGCGCCGTCTCCGGGCGCAGGAAAAACCGTCCATGTTTCGTTGACCA
CAGCGATGCCGACGATCGGCGCATCATGATAATTTTCTTCGACCACTTCAACGACAAGCGCC
GCCTTGTCGGCAAGCATCTCCTCCGTACGCGGTTCAGCAAGCGTAAATGCCAT
```

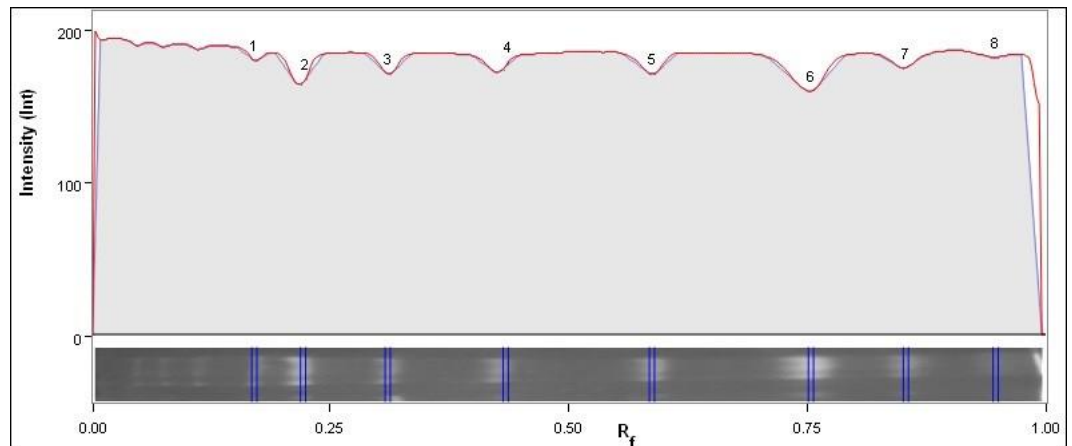
>secuencia_codificante_PolBst

AFTLADRVTEEMLADKAALVVEVVEENYHDAPIVGIAVVNEHGRFFLRPETALADPQFVA
WLGDETKKKSMFDSKRAAVALKWKGIELCGVSFDLLLAAYLLDPAQGVDDVAAAAKMK
QYEAVRPDEAVYGKGA KRAVPDEPVLAEHLVRKAAAIWALERPFLDELRRNEQDRLLVE
LEQPLSSILAEMEFAGVKVDTKRLEQMGEELAEQLRTVEQRIYELAGQEFNINSPKQLGVI
LFEKLQLPVLKKTGTGYSTSADVLEKLAPYHEIVENILHYRQLGKLQSTYIEGLLKVVRPDT
KKVHTIFNQALTQTGRLSSTEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVPSESDWLIFAADYSQIELRV
LAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQVSEDEVTPNMRRQAKAVNFGIVYGISDYGL
AQLNISRKEAAEFIERYFNFPGVKRYMENIVQEAKQKGYVTLLHRRRYLPDITSRNFN
VRSFAERMAMNTPIQGSAADIKKAMIDLNARLKEERLQARLLLQVHDELILEAPKEEMER
LCRLVPEVMEQAVTLRVPLKVDYHYGSTWYDAE

C. Anexo C: Determinación del tamaño molecular Bst1 image lab 6.1 (BIO RAD)



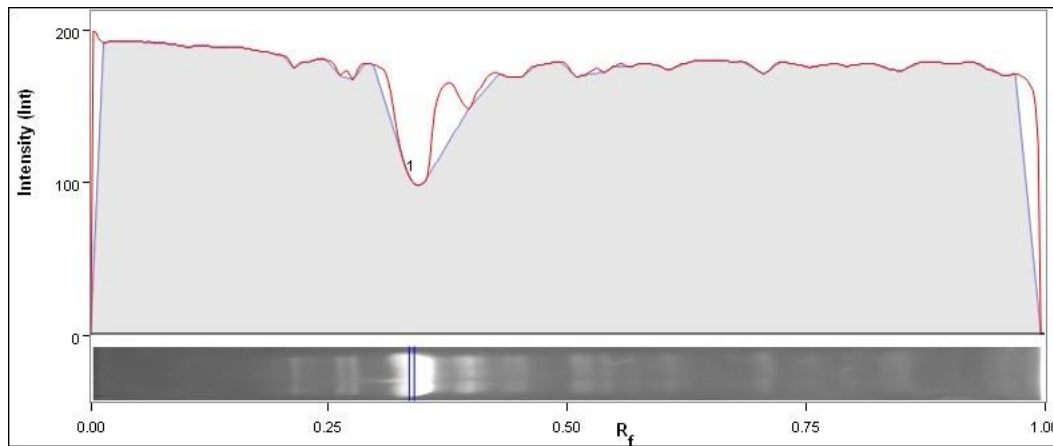
C. Carril 1 marcador de peso molecular (Opti protein XL Marker 245 kDa, NEB). intensidad de la banda vs factor de retención (R_f). Carril 2. Lisado Pol Bst 1. Carril 3. Lisado Pol Bst 2



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1	8	100,0	0,172	0	45.838	N/A	N/A	0,0	0,0
2	7	75,0	0,226	82	42.722	N/A	N/A	20,0	0,1
3	6	63,0	0,312	0	43.624	N/A	N/A	0,0	0,0
4	5	48,0	0,438	328	45.428	N/A	N/A	80,0	0,4
5	4	35,0	0,589	0	43.624	N/A	N/A	0,0	0,0
6	3	25,0	0,755	0	40.836	N/A	N/A	0,0	0,0
7	2	20,0	0,855	0	44.772	N/A	N/A	0,0	0,0
8	1	17,0	0,949	0	46.330	N/A	N/A	0,0	0,0

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: High
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 0.1
Lane Width	21.70 mm
Regression Equation	$y = -0.947 * x + 2.11$ R-squared value: $R^2 = 0.992624$

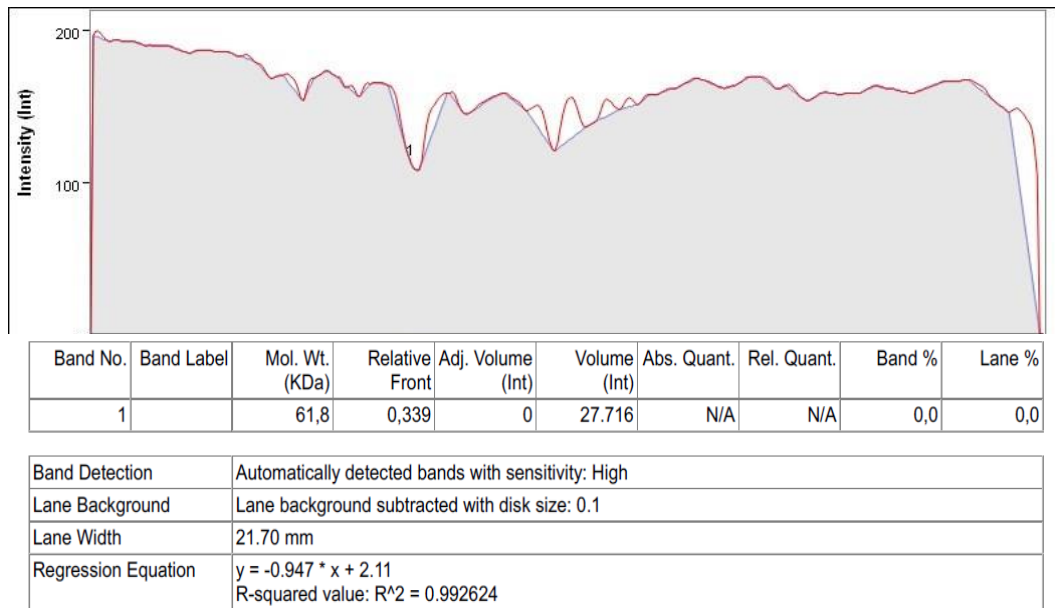
Carril 1 marcador de peso molecular (Opti protein XL Marker 245 kDa, NEB).



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		61,8	0,339	0	24.928	N/A	N/A	0,0	0,0

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: High
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 0.1
Lane Width	21.70 mm
Regression Equation	$y = -0.947 * x + 2.11$ R-squared value: $R^2 = 0.992624$

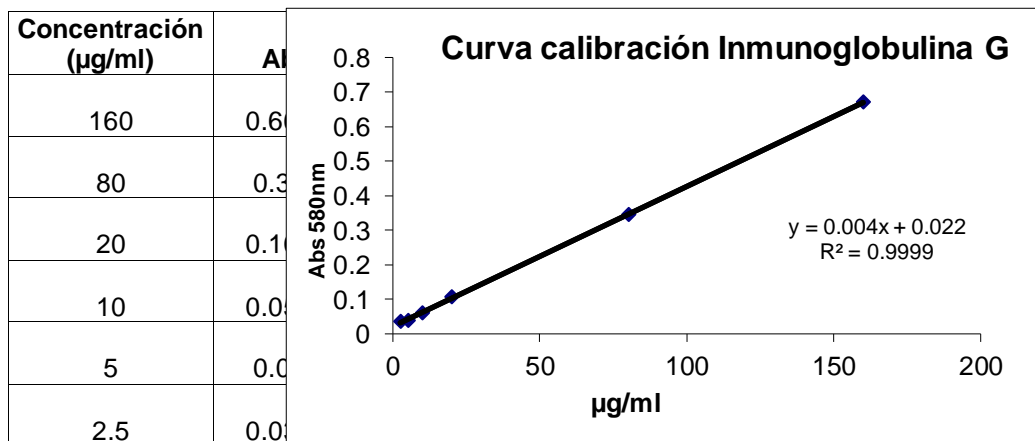
Carril 2 proteína Pol Bst. intensidad de la banda vs factor de retención (R_f).



Carril 3 proteína Pol Bst. intensidad de la banda vs factor de retención (R_f).

D: Curva de calibración Inmunoglobulina G

D. La curva de calibración se tomaron 6 puntos (1/2 1/4, 1/8 1/16, 1/32 y 1/64) posteriormente se hizo la regresión lineal de las dos variables encontrándose una tendencia lineal ($R^2 = 0,9999$):



D. Anexo E: Libertad de operación de Pol Bst.

E. Acceso a US 5830714 a través de LENS.ORG para verificación de patente para Pol Bst.

The screenshot shows the LENS.ORG website interface. The top navigation bar includes the LENS.ORG logo, language selection (English - EN), and various utility links like 'Our Apps', 'Pricing', 'About', 'Guest Work Area', 'Register', 'Sign in', and 'Support'. Below the navigation bar, there's a search bar with '2 Patent Results' and '174-728-020-443-020' displayed, and a search button. The main content area is divided into a left sidebar with filters (Date Range, Flags, Jurisdiction, Applicants, Inventors, Owners, Agents & Attorneys, Legal Status, Document Type, Cited Works, Biologicals, Classifications, Document Family) and a main panel. The main panel displays the patent details for 'Biologically active fragment of bacillus stearotherophilus DNA polymerase'. It includes the patent number 'US 5830714 A', its status 'Granted Patent', and family information. The legal status is 'Expired'. Key dates include 'Application No: 63347696', 'Filed: Apr 17, 1996', 'Published: Nov 3, 1998', and 'Granted: Nov 3, 1998'. The owner is 'Molecular Biology Resources Inc. a Wisconsin Corporation'. The inventors are 'Swaminathan Neela, Wilkosz Richard K'. The page also shows 'Cited Works: 2', 'Cited by: 85', 'Cites: 1', 'Sequences: 5', and 'Collections: 1'. A 'Granted Patent' box on the right lists 'US 5830714 A', '174-728-020-443-020', and 'View in Global Dossier'. At the bottom, there are tabs for 'Summary', 'Full-text', 'Family Info', 'Legal Info', 'Sequences', 'Citations', and 'Collections', along with action buttons like 'Share Patent', 'Search Family', 'Add to Collection', and 'Download Citation'.

Enlace de acceso: <https://www.lens.org/lens/patent/174-728-020-443-020/frontpage?l=en&locale=en>

Referencias bibliográficas

- Abbasi, H., Tabaraei, A., Hosseini, S. M., Khosravi, A., & Nikoo, H. R. (2022). Real-time PCR Ct value in SARS-CoV-2 detection: RdRp or N gene? *Infection*, *50*(2), 537. <https://doi.org/10.1007/S15010-021-01674-X>
- Agustriana, E., Nuryana, I., Laksmi, F. A., Dewi, K. S., Wijaya, H., Rahmani, N., Yudiargo, D. R., Ismadara, A., Helbert, Hadi, M. I., Purnawan, A., & Cameliawati Djohan, A. (2023). Optimized expression of large fragment DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* expression system. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *53*(4), 384–393. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2095573>
- Aidelberg, G., Aronoff, R., Eliseeva, T., Quero, F. J., Vielfaure, H., Codyre, M., Hadasch, K., & Lindner, A. B. (2021). Corona Detective: a simple, scalable, and robust SARS-CoV-2 detection method based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Biomolecular Techniques*, *32*(3), 89–97. <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-003>
- Alipoor, S. D., Mortaz, E., Jamaati, H., Tabarsi, P., Bayram, H., Varahram, M., & Adcock, I. M. (2021). COVID-19: Molecular and Cellular Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.563085>
- Aschenbrenner, J., & Marx, A. (2017). DNA polymerases and biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *48*, 187–195. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2017.04.005>
- Astatke, M., Grindley, N. D. F., & Joyce, C. M. (1995). Deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate binding sites in the catalytically competent ternary complex for the polymerase reaction catalyzed by DNA polymerase I (Klenow fragment). *Journal of Biological Chemistry*, *270*(4), 1945–1954. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1945>
- Bebenek, K. K. T. A. (2004). *FUNCTIONS OF DNA POLYMERASES*.

- Bentaleb, E. M., Abid, M., El Messaoudi, M. D., Lakssir, B., Ressami, E. M., Amzazi, S., Sefrioui, H., & Ait Benhassou, H. (2016). Development and evaluation of an in-house single step loop-mediated isothermal amplification (SS-LAMP) assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum samples from Moroccan patients. *BMC Infectious Diseases*, *16*(1), 517. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1864-9>
- Beyerstedt, S., Casaro, E. B., & Rangel, É. B. (2021). COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *40*(5), 905. <https://doi.org/10.1007/S10096-020-04138-6>
- Bio-Rad Laboratories. (2012). *General Protocol for Western Blotting*.
- 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>
- Buger, N. J. (1994). *The Bradford Method for Protein Quantitation*.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421/FIGURES/4>
- Chim, N., Jackson, L. N., Trinh, A. M., & Chaput, J. C. (2018). Crystal structures of DNA polymerase I capture novel intermediates in the DNA synthesis pathway. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.40444>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., Van Der Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, *25*(3), 1. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, *34*(15), 2666. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY149>

- De Coster, W., & Rademakers, R. (2023). NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 39(5).
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAD311>
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., & Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering*, 3(6), 461–467.
<https://doi.org/10.1093/PROTEIN/3.6.461>
- Doublié, S., & Ellenberger, T. (1998). The mechanism of action of T7 DNA polymerase. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(6), 704–712. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80089-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80089-4)
- Dunn, M. R., & Chaput, J. C. (2016). Reverse Transcription of Threose Nucleic Acid by a Naturally Occurring DNA Polymerase. *ChemBiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 17(19), 1804–1808. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201600338>
- Fijalkowska, J., Schaaper, R. M., Jonczyk, P., Banach-Orlowska, M., Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., & Jonczyk, P. (2005). DNA polymerase II as a fidelity factor in chromosomal DNA synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 58(1), 61–70. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04805.X>
- Garcia-Diaz, M., & Bebenek, K. (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(2), 105. <https://doi.org/10.1080/07352680701252817>
- Graziewicz, M. A., Longley, M. J., & Copeland, W. C. (2006). DNA polymerase γ in mitochondrial DNA replication and repair. *Chemical Reviews*, 106(2), 383–405. https://doi.org/10.1021/CR040463D/ASSET/CR040463D.FP.PNG_V03
- Greenough, L., Menin, J. F., Desai, N. S., Kelman, Z., & Gardner, A. F. (2014). Characterization of Family D DNA polymerase from *Thermococcus* sp. 9[°]N. *Extremophiles*, 18(4), 653. <https://doi.org/10.1007/S00792-014-0646-9>
- Güixens-Gallardo, P., Hocek, M., & Perlíková, P. (2016). Inhibition of non-templated nucleotide addition by DNA polymerases in primer extension using twisted intercalating nucleic acid modified templates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(2), 288–291. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2015.12.034>

Haendeler, J., Dröse, S., Büchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., Brandt, U., & Dimmeler, S. (2009). Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Binds to and Protects Mitochondrial DNA and Function From Damage. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(6), 929–935.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185546>

Hall, T. (1999). *BIOEDIT: A USER-FRIENDLY BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR AND ANALYSIS PROGRAM FOR WINDOWS 95/98/ NT*.

https://doi.org/10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-14998U1.29

Hamilton, N. H., & Furey, T. S. (2023). <tt>ROCCO</tt> : A Robust Method for Detection of Open Chromatin via Convex Optimization. *Bioinformatics*.

<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAD725>

Henikoff, S., & Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10915. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.22.10915>

Hu, B., Ge, X., Wang, L. F., & Shi, Z. (2015). Bat origin of human coronaviruses
Coronaviruses: Emerging and re-emerging pathogens in humans and animals Susanna
Lau Positive-strand RNA viruses. *Virology Journal*, 12(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/S12985-015-0422-1/FIGURES/1>

Huber, L. B., Betz, K., & Marx, A. (2023). Reverse Transcriptases: From Discovery and Applications to Xenobiology. *ChemBioChem*, 24(5), e202200521.

<https://doi.org/10.1002/CBIC.202200521>

Hurtado, L., Díaz, D., Escorcía, K., Flórez, L., Bello, Y., Díaz, Y., Navarro, E., Pacheco, L. C., Galán, N., Maestre, R., Acosta, A., & Pacheco, L. A. (2022). Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2. *Biomédica*, 42(Suppl 2), 59. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.6523>

INS. (2024). *Coronavirus Colombia*. Instituto Nacional de Salud.

<https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>

Jackson, L. N., Chim, N., Shi, C., & Chaput, J. C. (2019). Crystal structures of a natural DNA polymerase that functions as an XNA reverse transcriptase. *Nucleic Acids Research*, 47(13), 6973. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ513>

- Jana, M., Ghosh, A., Santra, A., Kar, R. K., Misra, A. K., & Bhunia, A. (2017). Synthesis of novel muramic acid derivatives and their interaction with lysozyme: Action of lysozyme revisited. *Journal of Colloid and Interface Science*, *498*, 395–404. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.03.060>
- Jeck, W. R., Iafrate, A. J., & Nardi, V. (2021). Nanopore Flongle Sequencing as a Rapid, Single-Specimen Clinical Test for Fusion Detection. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *23*(5), 630–636. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2021.02.001>
- Jones, M. D., & Foulkes, N. S. (1989). Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, *17*(20), 8387–8388. <https://doi.org/10.1093/NAR/17.20.8387>
- Kabir, M. S., Clements, M. O., & Kimmitt, P. T. (2015). RT-Bst: An integrated approach for reverse transcription and enrichment of cDNA from viral RNA. *British Journal of Biomedical Science*, *72*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1080/09674845.2015.11666788>
- Karam, J. D., & Konigsberg, W. H. (2000). DNA polymerase of the T4-related bacteriophages. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *64*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(00\)64002-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(00)64002-3)
- Kashir, J., & Yaqinuddin, A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*, *141*, 109786. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2020.109786>
- Kelleher, C., Teixeira, M. T., Förstemann, K., & Lingner, J. (2002). Telomerase: Biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(11), 572–579. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02206-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02206-5)
- Kiefer, J. R., Mao, C., Hansen, C. J., Basehore, S. L., Hogrefe, H. H., Braman, J. C., & Beese, L. S. (1997a). Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure*, *5*(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00169-X)
- Kiefer, J. R., Mao, C., Hansen, C. J., Basehore, S. L., Hogrefe, H. H., Braman, J. C., & Beese, L. S. (1997b). Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure*, *5*(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00169-X)

- Kolmogorov, M., Bickhart, D. M., Behsaz, B., Gurevich, A., Rayko, M., Shin, S. B., Kuhn, K., Yuan, J., Pevnikov, E., Smith, T. P. L., & Pevzner, P. A. (2020). metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. *Nature Methods* 2020 17:11, 17(11), 1103–1110. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00971-x>
- Kornberg, A. (1960). Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*, 131(3412), 1503–1508. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.131.3412.1503/ASSET/970D30A2-F8D7-4244-BA29-796FBAD48625/ASSETS/SCIENCE.131.3412.1503.FP.PNG>
- Kornberg A y Baker T. (1992). DNA replication. *Freeman*.
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2256–2268. <https://doi.org/10.1107/S0907444904026460>
- Kwok, H., Briggs, K., & Tabard-Cossa, V. (2014). Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown. *PLOS ONE*, 9(3), e92880. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0092880>
- Lee, J. Y., Kong, M., Oh, J., Lim, J. S., Chung, S. H., Kim, J. M., Kim, J. S., Kim, K. H., Yoo, J. C., & Kwak, W. (2021). Comparative evaluation of Nanopore polishing tools for microbial genome assembly and polishing strategies for downstream analysis. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00178-w>
- Leger, A., & Leonardi, T. (2019). pycoQC, interactive quality control for Oxford Nanopore Sequencing. *Journal of Open Source Software*, 4(34), 1236. <https://doi.org/10.21105/joss.01236>
- Li, J. J., Xiong, C., Liu, Y., Liang, J. S., & Zhou, X. W. (2016). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Emergence as an alternative technology for herbal medicine identification. *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), 214697. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01956/BIBTEX>
- Ling, H., Boudsocq, F., Woodgate, R., & Yang, W. (2001). Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: A mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell*, 107(1), 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00515-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00515-3)

Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme kinetics : a modern approach*. Wiley-Interscience.

Marra, M. A., Jones, S. J. M., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S. N., Khattra, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier, A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., ... Roper, R. L. (2003). The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, *300*(5624), 1399–1404.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1085953/SUPPL_FILE/MARRA.SOM.PDF

Martin, S. K., & Wood, R. D. (2019). DNA polymerase ζ in DNA replication and repair. *Nucleic Acids Research*, *47*(16), 8348–8361. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ705>

Mayanagi, K., Oki, K., Miyazaki, N., Ishino, S., Yamagami, T., Morikawa, K., Iwasaki, K., Kohda, D., Shirai, T., & Ishino, Y. (2020). Two conformations of DNA polymerase D-PCNA-DNA, an archaeal replisome complex, revealed by cryo-electron microscopy. *BMC Biology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-020-00889-Y>

McGuffie, M. J., & Barrick, J. E. (2021). pLannotate: engineered plasmid annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W516–W522.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB374>

Minciencias. (2021). *resolucion_0665-2021 (2)*.

Mo, J. Y., & Schaaper, R. M. (1996). Fidelity and error specificity of the α catalytic subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(31), 18947–18953. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18947>

Molero, J. M., Arranz-Izquierdo, J., Gutiérrez-Pérez, M. I., & Redondo Sánchez, J. M. (2021). Aspectos básicos de la COVID-19 para el manejo desde atención primaria. *Atencion Primaria*, *53*(6), 101966. <https://doi.org/10.1016/J.APRIM.2020.12.007>

Morales, F. D., Coronado-Jimenez, L., Gonzalez-Moya, V., Mercedes-Zambrano, M., Sandoval-Herrera, J., & Arturo-Calvache, J. E. (2022). *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS Effect of agitation on Taq DNA polymerase production by Escherichia coli in bioreactor*. www.cetjournal.it

- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Neagu, M., Constantin, C., & Surcel, M. (2021). Testing Antigens, Antibodies, and Immune Cells in COVID-19 as a Public Health Topic—Experience and Outlines. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(24). <https://doi.org/10.3390/IJERPH182413173>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000a). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000b). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63>
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G. C., Wang, Z., & Woodgate, R. (2001). The Y-family of DNA Polymerases. *Molecular Cell*, 8(1), 7–8. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00278-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00278-7)
- Oliveira, B. B., Veigas, B., & Baptista, P. V. (2021). Isothermal Amplification of Nucleic Acids: The Race for the Next “Gold Standard.” *Frontiers in Sensors*, 2, 752600. <https://doi.org/10.3389/FSENS.2021.752600>
- O’Reilly, M., Teichmann, S. A., & Rhodes, D. (1999). Telomerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(1), 56–65. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80008-6)
- Oscorbin, I., & Filipenko, M. (2023a). Bst polymerase — a humble relative of Taq polymerase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 4519–4535. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2023.09.008>
- Oscorbin, I., & Filipenko, M. (2023b). Bst polymerase — a humble relative of Taq polymerase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 4519. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2023.09.008>

Palacios, M., Santos, E., Velázquez Cervantes, M. A., & León Juárez, M. (2021). COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. *Revista Clínica Española*, 221(1), 55. <https://doi.org/10.1016/J.RCE.2020.03.001>

Phang, S.-M., Teo, C.-Y., Lo, E., Wong, V., & Wong, T. (1995). Cloning and complete sequence of the DNA polymerase-encoding gene (Bstpoll) and characterisation of the Klenow-like fragment from *Bacillus stearothermophilus* (DNA sequencing; genomic library; homologies; recombinant). In *Gene* (Vol. 163, Issue 65).

Prakash, S., Johnson, R. E., & Prakash, L. (2005). EUKARYOTIC TRANSLATION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function. *https://doi.org/10.1146/Annurev.Biochem.74.082803.133250*, 74, 317–353. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.74.082803.133250>

QIAGEN. (2010). *Quick-Start Protocol Sample & Assay Technologies QIAprep® Spin Miniprep Kit*. www.qiagen.com/contact.

Rabe, B. A., & Cepko, C. (2020). SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(39), 24450–24458. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2011221117/-/DCSUPPLEMENTAL>

Ramírez, M., Angulo, M. V., Colciencias, G., Fernando, D., Losada, H., Monroy, S. E., & Subdirectora, V. (2019). *Misión internacional de sabios para el avance de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación. Pacto por la Ciencia, la Tecnología y la Innovación: Un sistema para construir el conocimiento del futuro* Presidencia de la República Iván Duque Márquez Vicepresidencia de la República.

Rastgoo, N., Sadeghizadeh, M., Bambaie, B., & Hosseinkhani, S. (2009). Restoring 3'-5' exonuclease activity of thermophilic *Geobacillus* DNA polymerase I using site-directed mutagenesis in active site. *Journal of Biotechnology*, 144(4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.09.006>

Rivera, M., Cazaux, S., Cerda, A., Medina, A. A., Núñez, I., Matute, T., Brown, A., Gasulla, J., Federici, F., & Ramirez-Sarmiento, C. A. (2020). *Recombinant protein expression and purification of codon-optimized Bst-LF polymerase* Reclone.org (The Reagent Collaboration Network). <https://doi.org/10.17504/PROTOCOLS.IO.BKSRKWD6>

- Robert Novy and Barbara Morri. (2003). Glucose supression. *InNovations* , 13.
- Saldanha, R., Chen, B., Wank, H., Matsuura, M., Edwards, J., & Lambowitz, A. M. (1999). RNA and protein catalysis in group II intron splicing and mobility reactions using purified components. *Biochemistry*, 38(28), 9069–9083. <https://doi.org/10.1021/bi982799l>
- Schrödinger, L. , & D. W. (2020). *PyMOL* | pymol.org. <https://pymol.org/2/#page-top>
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG52>
- Sellmann, E., Schroder, K. L., Knoblich, I. M., & Westermann, P. (1992). Purification and characterization of DNA polymerases from Bacillus species. *Journal of Bacteriology*, 174(13), 4350. <https://doi.org/10.1128/JB.174.13.4350-4355.1992>
- Shanbhag, V., Sachdev, S., Flores, J. A., Modak, M. J., & Singh, K. (2018). Family A and B DNA Polymerases in Cancer: Opportunities for Therapeutic Interventions. *Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY7010005>
- Shcherbakova, P. V., Pavlov, Y. I., Chilkova, O., Rogozin, I. B., Johansson, E., & Kunkel, T. A. (2003). Unique Error Signature of the Four-subunit Yeast DNA Polymerase ϵ . *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43770–43780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306893200>
- Shi, C., Shen, X., Niu, S., & Ma, C. (2015). Innate Reverse Transcriptase Activity of DNA Polymerase for Isothermal RNA Direct Detection. *Journal of the American Chemical Society*, 137(43), 13804–13806. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b08144>
- Singh, K., Srivastava, A., Patel, S. S., & Modak, M. J. (2007). Participation of the fingers subdomain of Escherichia coli DNA polymerase I in the strand displacement synthesis of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10594–10604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611242200>
- Sluis-Cremer, N. (2021). Retroviral reverse transcriptase: Structure, function and inhibition. *The Enzymes*, 50, 179–194. <https://doi.org/10.1016/BS.ENZ.2021.06.00>

- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, *24*(6), 490. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.03.003>
- Tanner, N. A., & Evans, T. C. (2013). Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, *SUPPL.105*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
- Tsai, C. H., Chen, J., & Szostak, J. W. (2007). Enzymatic synthesis of DNA on glycerol nucleic acid templates without stable duplex formation between product and template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(37), 14598–14603. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0704211104>
- Uchiyama, Y., Takeuchi, R., Kodera, H., & Sakaguchi, K. (2009). Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie*, *91*(2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2008.07.005>
- Vandenberg, O., Martiny, D., Rochas, O., van Belkum, A., & Kozlakidis, Z. (2020). Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nature Reviews Microbiology* *2020 19:3*, *19*(3), 171–183. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00461-z>
- Wang, Y., Ngor, A. K., Nikoomanzar, A., & Chaput, J. C. (2018). Evolution of a General RNA-Cleaving FANA Enzyme. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07611-1>
- Wardle, J., Burgers, P. M. J., Cann, I. K. O., Darley, K., Heslop, P., Johansson, E., Lin, L. J., McGlynn, P., Sanvoisin, J., Stith, C. M., & Connolly, B. A. (2008). Uracil recognition by replicative DNA polymerases is limited to the archaea, not occurring with bacteria and eukarya. *Nucleic Acids Research*, *36*(3), 705–711. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM1023>
- Worldometer. (2024). *COVID Live - Coronavirus Statistics - Worldometer*. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
- Yamitch, J., & Sweasy, J. B. (2010). DNA Polymerase Family X: Function, Structure, and Cellular Roles. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1804*(5), 1136. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2009.07.008>

Zhao, C., & Pyle, A. M. (2016). Crystal structures of a group II intron maturase reveal a missing link in spliceosome evolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(6), 558. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3224>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2001017>