



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 317**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/96** (2006.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99931875 .1**  
86 Fecha de presentación : **23.06.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1088060**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2001**

54 Título: **Estabilización de enzimas por tensioactivos catiónicos.**

30 Prioridad: **24.06.1998 US 90539 P**  
**22.06.1999 US 338174**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.01.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.01.2008**

73 Titular/es: **PROMEGA CORPORATION**  
**2800 Woods Hollow Road**  
**Madison, Wisconsin 53711-5399, US**

72 Inventor/es: **Shultz, John, W. y**  
**Huang, Fen**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 288 317 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Estabilización de enzimas por tensioactivos catiónicos.

**5 Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con estabilización de proteínas, particularmente con la estabilización de polimerasas en soluciones acuosas que contienen tensioactivos catiónicos.

**10 Antecedentes de la invención**

La estabilización de enzimas es necesaria para su almacenamiento durante tiempos largos y para su utilización en muchos procesos bioquímicos y biotecnológicos. Se han aislado enzimas que son estables a la desnaturalización por calor a partir de organismos termófilos. Sin embargo, incluso estas enzimas altamente termoestables, se pueden inactivar por agentes químicos, proteasas o modificaciones ambientales. La utilización de enzimas termoestables y de otras enzimas requiere a menudo el uso concomitante de condiciones desnaturalizantes que incluyen elevadas temperaturas, ambientes acuosos con concentraciones subóptimas de cofactores y sustratos y un pH que es subóptimo para la estabilidad máxima de la enzima.

Se conocen muchas técnicas de estabilización. Estas técnicas incluyen inmovilización de la enzima sobre sustratos sólidos, modificación química de la enzima, ingeniería genética de la enzima y la adición de aditivos de estabilización. Se ha mostrado que los tensioactivos son un grupo de aditivos que estabilizan enzimas. Los tensioactivos son compuestos activos de superficie que estabilizan la interfase entre la forma activa de la enzima y el líquido ambiente en el que están contenidas.

Por ejemplo, se ha mostrado en varias ocasiones que los detergentes no iónicos incrementan la estabilidad en solución de diversas proteínas con actividad enzimática (por ejemplo, la proteína quinasa dependiente de c-AMP, la tirosina hidroxilasa, la óxido nítrico sintasa, la triptófano hidroxilasa y la beta-amilasa del boniato). Adicionalmente, se ha mostrado que los detergentes no iónicos, tales como el TRITON X-100 y el Tween 20, estabilizan la actividad de las ADN polimerasas (Ver, por ejemplo, Biochem., 14: 789-95 [1975]). La Solicitud de Patente Europea 776.970 A1 revela la utilización de detergentes no iónicos que incluyen el monolaurato de sorbitan polioxiethylado (Tween 20) y el alquilfenol etoxilado (NP-40) para estabilizar la actividad de la ADN polimerasa termoestable, *Taq*.

Martelli *et al.*, 1994, Cell Biochemistry and function, Vol 12, páginas 37-44, revelan un intento de solubilización de una ADN polimerasa unida a la matriz nuclear, preparada con detergentes aniónicos a partir de células HeLa 3S. Weyant *et al.*, 1990, Biotechniques, Vol. 9, páginas 308-309, revelan composiciones de la ADN polimerasa *Taq* y diversos detergentes aniónicos. El documento WO-A-94-12623 revela un procedimiento de estabilización de una solución de enzima por la adición de alquildiamina polietoxilada y de un óxido de amina. Wilson *et al.*, 1972, Biochem Biophys. Res. Comm., Vol 49, páginas 1093-1099, revelan fracciones subcelulares brutas de ADN polimerasas y el tensioactivo bromuro de cetiltrimetilamonio, CETAB.

Se ha mostrado que concentraciones bajas del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS) estabilizan la actividad de enzimas. Sin embargo, debido a la posibilidad de unión cooperativa, si se excede la concentración óptima de SDS en solución, la utilización de SDS en estabilización de proteínas es limitada. Se conoce, sin embargo, que muchos detergentes catiónicos se unen menos fuertemente a las proteínas que los detergentes aniónicos fuertes, tales como el SDS (Ver por ejemplo, Nozaki *et al.*, J. Biol. Chem., 249: 4452-59 [1974]). Además, la mayoría de las proteínas tienen menos sitios de unión catiónicos que aniónicos.

La utilidad de enzimas, tales como las ADN polimerasas está limitada, a menudo, por la estabilidad de la polimerasa en solución. Así, existe una necesidad de aditivos que mejoren la estabilidad de las enzimas en solución, particularmente de aquellos aditivos que mejoran la estabilidad y que eviten además las desventajas de los tensioactivos utilizados actualmente.

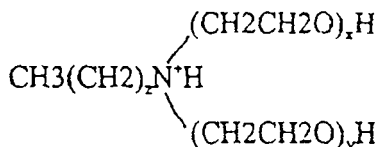
**Resumen de la invención**

La presente invención está definida en las reivindicaciones y está relacionada con la estabilización de proteínas, particularmente con la estabilización de polimerasas en soluciones acuosas con tensioactivos catiónicos.

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una mezcla de una proteína que tiene actividad enzimática y un tensioactivo catiónico que tienen un valor del índice HLB de aproximadamente 11 a 16. La presente invención no está limitada a ninguna enzima en particular. De hecho, se contempla la estabilización de una variedad de enzimas. En algunas formas de realización preferidas, la proteína es una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli*, *Taq* polimerasa, *Tne* polimerasa, *Tth* polimerasa, ADN polimerasa de T4, ARN polimerasa II, ARN polimerasa de SP6, ARN polimerasa de T7, transcriptasa reversa de AMV, transcriptasa reversa de MMLV, etc.). En otras formas de realización, la enzima es preferentemente una quinasa, fosforilasa o fosfatasa (por ejemplo, la fosfatasa intestinal de ternera).

## ES 2 288 317 T3

Del mismo modo, la presente invención no está limitada a un tensioactivo catiónico en particular. De hecho, se contemplan una variedad de tensioactivos catiónicos. El tensioactivo catiónico tiene un valor del índice HLB de aproximadamente 11 a 16. En otras formas de realización, el tensioactivo catiónico es una amina polietoxilada. En algunas formas de realización particularmente preferidas, la amina polietoxilada tiene la estructura siguiente:



En algunas formas de realización,  $z$  es un número entero de aproximadamente 15 a 20, más preferentemente 18. En otras formas de realización  $x+y$  tiene un valor medio de aproximadamente 5 a 15, de forma que el valor del índice HLB es aproximadamente de 11 a 16. En algunas formas de realización preferidas,  $x+y$  tiene un valor medio de 5 ó 15. En algunas formas de realización, el nitrógeno puede estar sustituido con un radical fósforo, azufre o arsénico. Todavía, en otras formas de realización, el tensioactivo catiónico está presente en la solución o mezcla en una concentración aproximadamente del 0,0005 al 1,0% en volumen.

En algunas formas de realización, la mezcla o solución incluye un reactivo de tamponamiento. La presente invención no está limitada a un reactivo de tamponamiento en particular. De hecho, se contemplan una variedad de reactivos de tamponamiento. En algunas formas de realización, el reactivo de tamponamiento es preferentemente un tampón MOPS, HEPES o Tris. En otras formas de realización, la concentración de tampón en la solución es aproximadamente de 10 mM a 70 mM. En algunas formas de realización, el pH es aproximadamente de 7,0 a 9,2.

En otras formas de realización, la solución o mezcla incluye una sal monovalente y/o una sal divalente. La presente invención no está limitada a ninguna sal en particular. De hecho, se contemplan una variedad de sales que incluyen, pero no se limitan a, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>. En algunas formas de realización, el catión divalente está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 a 10 mM. En otras formas de realización, el catión monovalente está presente en una concentración de aproximadamente 1 a 100 mM.

Todavía en formas de realización adicionales, la solución o mezcla incluye un quelante y/o un agente reductor. La presente invención no está limitada a ningún quelante ni agente reductor en particular. De hecho, se contemplan una variedad de quelantes y agentes reductores. Los agentes quelantes preferidos incluyen, pero no se limitan a, EDTA y EGTA. Los agentes reductores preferidos incluyen, pero no se limitan a, ditioneol y β-mercaptoetanol. En algunas formas de realización, el agente quelante está presente en una concentración de aproximadamente 0,01 a 10 mM. En otras formas de realización, el agente reductor está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 a 20 mM.

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona procedimientos para la estabilización de proteínas con actividad enzimática. En algunas formas de realización, se proporcionan una proteína con actividad enzimática (por ejemplo, una polimerasa, quinasa, fosfatasa o fosforilasa) y un tensioactivo catiónico que tenga un valor del índice HLB aproximadamente de 11 a 16. En formas de realización particularmente preferidas, el tensioactivo catiónico es una amina polietoxilada, como se describió anteriormente. En otras formas de realización, la proteína con actividad enzimática y el tensioactivo catiónico se combinan de forma que la actividad de la enzima se estabiliza, en comparación con la actividad de la enzima en ausencia del tensioactivo catiónico.

### Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, se definirán a continuación algunos términos.

Como se utiliza aquí, el término “enzima” se refiere a moléculas o agregados moleculares que son responsables de catalizar reacciones químicas y biológicas. Estas moléculas son típicamente proteínas, pero pueden comprender también péptidos cortos, ARN, ribozimas, anticuerpos y otras moléculas. Una molécula que cataliza reacciones químicas y biológicas se refiere como “que tiene actividad enzimática” o “que tiene actividad catalítica”.

Como se utiliza aquí, el término “estabilización”, “estabilizante” y “estabilizado”, cuando se utiliza en referencia a una actividad enzimática, se refiere a la capacidad de un material para mantener, aumentar, o inhibir por el contrario el descenso o pérdida de actividad de una enzima, a menudo, cuando se mide a lo largo del tiempo (esto es, en presencia de un estabilizador, una enzima retiene su actividad durante un periodo de tiempo mayor que cuando la enzima está en ausencia del estabilizador). La “estabilización de una actividad enzimática” se refiere también a la capacidad de un material para mantener la actividad de una enzima bajo condiciones subóptimas de temperatura o pH. Como otro ejemplo, “estabilizante de una actividad enzimática” se refiere a la capacidad de un material para aumentar la actividad de la enzima bajo condiciones subóptimas, en comparación con la actividad en ausencia de un compuesto o material “estabilizante”.

El término “polimerasa” se refiere a una enzima que sintetiza cadenas de ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN) a partir de ribonucleósidos trifosfatos o de los deoxinucleósido trifosfatos.

## ES 2 288 317 T3

El término “actividad de la polimerasa” se refiere a la capacidad una enzima para sintetizar una forma de ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN) a partir de los ribonucleósidos trifosfato o de los deoxinucleósidos trifosfato. Las ADN polimerasas sintetizan ADN, mientras que las ARN polimerasas sintetizan ARN.

5 El término “tensoactivo” se refiere a cualquier molécula que tenga tanto un grupo polar de cabeza, que energéticamente prefiere la solvatación por agua, como una cola hidrofóbica que no está bien solvatada por agua. El término “tensoactivo catiónico” se refiere a un tensoactivo con un grupo catiónico de cabeza. El término “tensoactivo aniónico” se refiere a un tensoactivo con un grupo aniónico de cabeza.

10 Los términos “Valor del Índice de Equilibrio Hidrófilo-Lipófilo” y “Valor del Índice HLB” se refieren a un índice para correlacionar la estructura química de las moléculas de tensoactivo con su actividad de superficie. El Valor del Índice HLB se puede calcular por numerosas fórmulas empíricas como describe Meyers (Meyers, Surfactant Science and Technology, VCH Publishers Inc., New York, pp. 231-245 [1992]), incorporado aquí como referencia. Como se utiliza aquí, el Valor del Índice HLB de un tensoactivo es el Valor del Índice HLB asignado al tensoactivo en McCutcheon’s Volumen 1: Emulsifiers and Detergents North American Edition, 1996, incorporado aquí como referencia. El Valor del Índice HLB para los tensoactivos comerciales oscila en el intervalo de 0 a aproximadamente 70 o más. Los tensoactivos hidrófilos con alta solubilidad en agua y con propiedades de solubilización, están en el extremo superior de la escala, mientras que los tensoactivos con baja solubilidad en agua, que son buenos solubilizadores de agua en aceites, están en el extremo inferior de la escala.

20 El término “amina polietoxilada” se refiere a cualquier tensoactivo que incluye una cadena lateral alquilo hidrofóbica y uno o más grupos polioxitileno de cadena larga.

25 Los términos “tampón” o “agentes de tamponamiento” se refieren a materiales que cuando se añaden a una solución, provocan que la solución sea resistente a los cambios en el pH.

Los términos “agente reductor” y “donador de electrones” se refieren a un material que dona electrones a un segundo material para reducir el estado de oxidación de uno o más átomos del segundo material.

30 El término “sal monovalente” se refiere a cualquier sal en la que el metal (por ejemplo, Na, K o Li) tiene una carga neta de 1+ en solución (esto es, un protón más que electrón).

35 El término “sal divalente” se refiere a cualquier sal en la que el metal (por ejemplo, Mg, Ca o Sr) tiene una carga neta de 2+ en solución.

Los términos “quelante” o “agente quelante” se refieren a cualquier material que tiene más de un átomo con un par de electrones desapareados que están disponibles para unirse a un ión metálico.

40 El término “solución” se refiere a una mezcla acuosa o no acuosa.

El término “solución de tamponamiento” se refiere a una solución que contiene un reactivo de tamponamiento.

45 El término “tampón de reacción” se refiere a una solución de tamponamiento en la que se realiza una reacción enzimática.

El término “tampón de almacenamiento” se refiere a una solución de tamponamiento en la que se almacena una enzima.

50 “Amplificación” es un caso especial de replicación de un ácido nucleico que implica especificidad de molde. Contrasta con la replicación no específica de molde (esto es, la replicación que depende de molde pero que no depende de un molde específico). La especificidad de molde se distingue aquí de la fidelidad de replicación (esto es, síntesis de la secuencia de polinucleótidos apropiada) y de la especificidad de nucleótidos (ribo- o desoxirribo-). La especificidad de molde se describe frecuentemente en términos de “especificidad de diana”. Las secuencias diana son “dianas” en el sentido de que se buscan para aislarse de otro ácido nucleico. Las técnicas de amplificación se han diseñado primariamente para este aislamiento.

60 En la mayoría de las técnicas de amplificación, la especificidad de molde se alcanza mediante la elección de la enzima. Las enzimas de amplificación son enzimas que, bajo las condiciones en las que se utilizan, sólo procesarán secuencias específicas de ácido nucleico en una mezcla heterogénea de ácidos nucleicos. Por ejemplo, en el caso de la replicasa de  $\phi\phi$ , el ARN MDV-1 es el molde específico de la replicasa (Kacian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3038 [1972]). Otros ácidos nucleicos no se replicaran mediante esta enzima de amplificación. Similarmente, en el caso de la ARN polimerasa de T7, esta enzima de amplificación tiene una especificidad restringida hacia sus propios promotores (Chamberlin *et al.*, Nature 228: 227 [1970]). En el caso de la ADN ligasa de T4, la enzima no ligará los dos oligonucleótidos o polinucleótidos, en los que haya un error de apareamiento entre el oligonucleótido o polinucleótido sustrato y el molde, en el punto de ligamiento (Wu y Wallace, Genomics 4: 560 [1989]). Finalmente, se ha visto que las polimerasas *Taq* y *Pfu*, en virtud de su capacidad para funcionar a altas temperaturas, presentan una alta especificidad por las secuencia unidas, y definidas de esta forma, por los cebadores; la alta temperatura resulta en

## ES 2 288 317 T3

condiciones termodinámicas que favorecen la hibridación del cebador con las secuencias diana y no la hibridación con las secuencias que no son diana (Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press [1989]).

5 Como se utiliza aquí, el término “ácido nucleico amplificable” se utiliza en referencia a ácidos nucleicos que se pueden amplificar por cualquier procedimiento de amplificación. Se contempla que el “ácido nucleico amplificable” comprenda, usualmente, el molde de muestra.

10 Como se utiliza aquí, el término “molde de la muestra” se refiere a un ácido nucleico originado a partir de una muestra que se está analizando para detectar la presencia de una “diana” (definida a continuación). En contraste, “molde de fondo” se utiliza en referencia a un ácido nucleico, distinto del molde de la muestra, que puede o puede no estar presente en una muestra. El molde de fondo pasa inadvertido frecuentemente. Puede resultar de arrastre, o puede deberse a la presencia de ácidos nucleicos contaminantes, que se deben buscar para su eliminación de la muestra. Por ejemplo, en una muestra bajo análisis pueden estar presentes, como fondo, ácidos nucleicos de los organismos, distintos de aquellos que se quieren detectar.

15 Como se utiliza aquí, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, que puede ocurrir naturalmente, como en un digerido, por una enzima de restricción, purificado, o se puede producir sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se somete a las condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la hebra de un ácido nucleico (esto es, en presencia de nucleótidos y de un agente inductor, tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). Para una eficiencia máxima en la amplificación, el cebador es preferentemente de una única cadena, pero alternativamente, puede ser de cadena doble. Si es de cadena doble, el cebador se debe tratar primero para separar sus cadenas, antes de que se pueda utilizar para preparar los productos de extensión. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de un agente inductor. Las longitudes exactas de los oligonucleótidos cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento.

20 Como se utiliza aquí, el término “sonda” se refiere a un oligonucleótido (esto es, una secuencia de nucleótidos), que puede ocurrir naturalmente, como en un digerido, por una enzima de restricción, purificado o se puede producir sintéticamente, por recombinación o por amplificación por PCR, que es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser de cadena única o doble. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de un gen particular. Se contempla que, en formas de realización preferidas, cualquier sonda utilizada en la presente invención esté marcada con cualquier “molécula indicadora” de forma que sea detectable por cualquier sistema de detección, que incluye, pero no se limita a, sistemas de enzima (por ejemplo, ELISA, y ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescencia, radiactividad y sistemas luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección o marcaje particular.

25 Como se utiliza aquí, el término “diana” cuando se utiliza en referencia a una reacción en cadena de la polimerasa, se refiere a la región del ácido nucleico unida por los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa. Así, se identifica y se aísla la “diana” de otras secuencias de ácidos nucleicos. Un “segmento” se define como una región de ácido nucleico en la secuencia diana.

30 Como se utiliza aquí, el término “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) se refiere al procedimiento de K.B. Mullis, descrito en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.683.195; 4.683.202 y 4.965.188, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia, que describe un procedimiento para incrementar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico, sin clonaje o purificación. Este procedimiento para la amplificación de una secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos oligonucleótidos cebadores en una mezcla de ADN, que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia precisa de ciclos de temperatura, en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia diana de doble cadena. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y, a continuación, los cebadores hibridan con sus secuencias complementarias en la molécula diana. Después de la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar una nueva pareja de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión por la polimerasa se pueden repetir muchas veces (esto es, desnaturalización, hibridación y extensión constituyen un “ciclo”; puede haber numerosos “ciclos”) para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina mediante las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto de repetición del proceso, el procedimiento se refiere como “reacción en cadena de la polimerasa” (a partir de ahora “PCR”). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la muestra, se dice que éstos están “amplificados por PCR”.

35 Es posible amplificar, mediante PCR, una única copia de una secuencia diana específica en ADN genómico hasta un nivel detectable por diferentes metodologías (por ejemplo, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados seguido por detección con un conjugado avidina-enzima; incorporación de desoxinucleótido trifosfatos, tales como dCTP o dATP, marcados con <sup>32</sup>P, en el segmento amplificado). Además de ADN genómico, se puede amplificar cualquier secuencia de oligonucleótido o polinucleótido con el conjunto apropiado de moléculas de cebadoras. En particular, los segmentos amplificados, creados por el proceso de PCR, son, a su vez, moldes eficientes para amplificaciones subsecuentes por PCR.

Como se utiliza aquí, los términos “producto de PCR”, “fragmento de PCR” y “producto de amplificación” se refieren a la mezcla de compuestos resultante después de que se hayan completado dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, hibridación y extensión. Estos términos incluyen el caso en el que ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.

Como se utiliza aquí, el término “reactivos de amplificación” se refiere a aquellos reactivos (desoxirribonucleótido trifosfatos, tampón, etc.), que se necesitan para la amplificación, exceptuando los oligonucleótidos cebadores, el molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Típicamente, los reactivos de amplificación junto con otros componentes de reacción se añaden y están contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

### Descripción general de la invención

La presente invención está definida en las reivindicaciones y proporciona procedimientos y composiciones para la estabilización de proteínas, particularmente para la estabilización de polimerasas en soluciones acuosas con tensioactivos catiónicos. La actividad de las polimerasas en solución, bien en tampones de almacenamiento como en tampones de reacción, se puede estabilizar por la adición de tensioactivos no iónicos. No se pretende que la presente invención esté limitada a un mecanismo particular de acción. Realmente, no es necesario un entendimiento de los mecanismos involucrados en la estabilización de proteínas, para realizar y utilizar la presente invención. Sin embargo, una teoría respecto al mecanismo de estabilización de proteínas por tensioactivos, es que la unión de un tensioactivo a una proteína ejerce una función reticulante que evita la pérdida de plegamiento o desnaturalización de la proteína. En el caso de tensioactivos no iónicos, la unión ocurre en los sitios hidrofóbicos de la superficie de la proteína.

Se ha revisado el mecanismo de unión de un tensioactivo a proteínas y la desnaturalización por algunos tensioactivos iónicos (Ver por ejemplo, Jones, en *Surface Activity of Proteins*, S. Magdassi (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 237-284 [1996]). La interacción inicial entre los tensioactivos iónicos y las proteínas está mediada por la unión de grupo de cabeza iónico a sitios de alta energía de la superficie de la proteína. Las interacciones del grupo de cabeza con sitios cargados en la superficie de la proteína son electrostáticas. Los tensioactivos aniónicos se unen a sitios catiónicos (por ejemplo, restos lisilo, histidilo y arginilo). Los tensioactivos catiónicos se unen a sitios aniónicos (por ejemplo, restos glutamilo y aspartilo). La cola hidrofóbica del tensioactivo interacciona posteriormente con las regiones hidrofóbicas de la superficie de la proteína.

Además, se conoce que muchos detergentes iónicos se unen cooperativamente con proteínas. La unión cooperativa está caracterizada por una pérdida del plegamiento de la estructura terciaria de la proteína, que permite la unión de más moléculas de tensioactivo. Se piensa que la pérdida de plegamiento inicial es el resultado de la inserción de la cola hidrofóbica del tensioactivo en el interior hidrofóbico de la proteína. La unión cooperativa resulta generalmente en la desnaturalización completa de la proteína, que resulta en pérdida de la actividad.

La afinidad de unión de los tensioactivos a las proteínas está mediada por la naturaleza del grupo de cabeza, por la longitud de la cadena de la cola hidrofóbica y por la concentración crítica micelar (CMC) del tensioactivo. Para los detergentes aniónicos, se ha demostrado que para los tensioactivos con una longitud de la cola hidrofóbica constante, la afinidad de unión decrece a medida que el grupo de cabeza polar se modifica, en el orden de  $\text{SO}_4^- > \text{SO}_3^- > \text{CO}_2^- > \text{OH}$ . También es un factor la longitud de la cadena. Por ejemplo, los sulfatos de alquilo muestran unión con pérdida extensiva de plegamiento cuando la longitud de la cadena de alquilo es  $\text{C}_{12}$  (esto es, 12 carbonos), y una unión sin pérdida extensiva de plegamiento ocurre cuando la longitud de la cadena es menor de  $\text{C}_{12}$ . En contraste con esto, para los sulfatos de alquilo, se ha mostrado que una longitud de cadena  $\text{C}_{12}$  no es suficiente para una unión cooperativa.

La unión cooperativa tiene lugar a concentraciones crecientes de tensioactivo. Si tiene lugar o no unión cooperativa depende de la CMC del tensioactivo. La CMC del tensioactivo es la concentración a la que las moléculas libres de tensioactivo presentes en una solución se agregan para formar micelas. Para la unión cooperativa de un tensioactivo a una proteína, la unión electrostática inicial ocurre a concentraciones de tensioactivo muy por debajo de la CMC del tensioactivo. Muchos tensioactivos, fuertemente desnaturizantes, tienen CMC relativamente altas. Para los tensioactivos con CMC bajas, un tensioactivo formará micelas, preferentemente, a concentraciones relativamente bajas de tensioactivo. Por tanto, una concentración de tensioactivo, suficiente para provocar desnaturalización de la proteína, no se alcanza en solución. Los detergentes no iónicos están limitados por sus CMC y por las concentraciones libres que ellos pueden alcanzar, de forma que la unión cooperativa y la desnaturalización no pueden ocurrir para cualquier exceso razonable de tensioactivo añadido.

La unión de tensioactivos a proteínas se estudia mediante la construcción de isotermas de unión. Las isotermas son curvas sigmoideas producidas al representar el número medio de moléculas de tensioactivo por molécula de proteína en función del logaritmo de la concentración de tensioactivo libre. La isoterma de unión tiene múltiples regiones. La primera región consiste en una pendiente que aumenta de forma relativamente fuerte que corresponde a la unión específica de tensioactivo a sitios cargados de la superficie de la proteína nativa o a regiones hidrofóbicas. Cuando estos sitios se saturan, comienza una región semejante a una meseta. Para tensioactivos que se unen cooperativamente con proteínas, es aparente una tercera región de pendiente pronunciada. Esta región ocurre generalmente a medida que el tensioactivo libre se aproxima a la concentración crítica micelar del tensioactivo.

Los modelos matemáticos de pérdida de plegamiento inducida por unión predicen que la unión de pequeñas cantidades de iones de alta afinidad protegen a una proteína de la pérdida de plegamiento inducida por otros agentes (Ver por ejemplo, Steinhardt y Reynolds (eds.), *Multiple Equilibrium and Proteins*, Academic Press, New York, pp. 234-350 (1969). La protección de la pérdida de plegamiento se basa en la interacción electrostática entre los grupos de cabeza cargados de algunos tensioactivos con restos cargados en la superficie de la proteína (Markus et al., *J. Biol. Chem.*, 239: 3687 [1964]). La unión posterior de la cola hidrofóbica a las áreas hidrofóbicas de la proteína, proporciona posteriormente una función de reticulado no covalente.

La presente invención proporciona tensioactivos que estabilizan la actividad de enzimas. En algunas formas de realización, los tensioactivos catiónicos alquilamina etoxilada Tomah E-18-5 y Tomah E-18-15 (Tomah Prod Inc, Milton, WI) proporcionan una estabilización igual o superior de las polimerasas en solución, en comparación con los tensioactivos no iónicos utilizados comúnmente, tales como Tween 20, TRITON X-100 y NP-40. En un ensayo, la estabilización por tensioactivo de las ADN polimerasas termoestables, aisladas de *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa), *Thermus thermophilus* (*Tth* polimerasa), y *Thermus flavus* (*Tfl* polimerasa) se midió por la capacidad de catalizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La cantidad de producto de reacción obtenido se tomo como una medida de la estabilidad de la enzima utilizada en la reacción. Se observaron mejores resultados cuando se utilizaban niveles menores de *Taq* o *Tth* polimerasa, junto con detergentes catiónicos. La amplificación de la secuencia diana de ADN fue fácilmente y reproduciblemente evidente en reacciones que contenían hasta un 50% menos de actividad polimerasa que la necesaria para amplificar la diana en las reacciones control con tensioactivo no iónico. En otro ensayo, se determinó que las semividas de las polimerasas *Tth* y *Taq* en tampones que contenían detergentes catiónicos, eran igual o mayor que sus semividas observadas en tampones que contenían tensioactivos no iónicos.

En otras formas de realización de la presente invención, también se utilizan tensioactivos catiónicos para estabilizar a otras enzimas que incluyen, pero no se limitan a, la ADN polimerasa de T4, la transcriptasa reversa de MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney) y la transcriptasa reversa de AMV (virus de la mieloblastosis aviar). En experimentos para demostrar la estabilización de estas enzimas, se ensamblaron mezclas de reacción de polimerización, que contenían moldes de ADN o ARN, utilizando bien el estabilizador estándar BSA (albúmina de suero bovino) o los tensioactivos catiónicos. Las actividades de la polimerasa de T4, y de las transcriptasas reversas de MMLV y AMV, determinadas por incorporación de dNTP radiactivos en los ácidos nucleicos, aumentaron en los tampones de reacción que contenían tensioactivos catiónicos, en comparación con los tampones de reacción que contenían BSA.

Los tensioactivos catiónicos de la presente invención son, por tanto, útiles para estabilizar a las polimerasas, tanto termoestables como termolábiles, que incluyen, pero no se limitan a, *Taq* polimerasa, *Tth* polimerasa, *Tfl* polimerasa, ADN polimerasa de T4, transcriptasa reversa de AMV y transcriptasa reversa de MMLV. Estos tensioactivos catiónicos son útiles como estabilizadores tanto en los tampones de reacción como en los tampones de almacenamiento.

## Descripción detallada de la invención

### A. Identificación de tensioactivos que estabilizan la actividad de enzimas

Se utilizaron diversos ensayos (ver los Ejemplos 1-12) para determinar las acciones de estabilización o desestabilización de aproximadamente 30 tensioactivos aniónicos, catiónicos y anfóteros (resumidos en la Tabla 1) diferentes. Estos experimentos demostraron que los tensioactivos catiónicos se pueden utilizar para estabilizar la actividad de enzimas. Se han encontrado muchas aplicaciones para los tensioactivos catiónicos que incluyen la utilización como fungicidas, como pesticidas y como agentes antisépticos en cosméticos. Los tensioactivos catiónicos se pueden dividir en dos grupos: 1) los que contienen nitrógeno; y 2) los tensioactivos "onio" sin nitrógeno que incluyen tensioactivos fosfonio, sulfonio, sulfoxonio y arsonio. Los tensioactivos que contienen nitrógeno se preparan de forma fácil y barata y son mucho más numerosos que los tensioactivos sin nitrógeno. Los tensioactivos que contienen nitrógeno se pueden dividir en dos categorías que difieren en la naturaleza del grupo que contiene nitrógeno. La primera categoría comprende los compuestos de nitrógeno alquilado tales como sales amonio simples que contienen un grupo alquilo de cadena larga que confiere hidrofobicidad y uno o más hidrógenos de amina. Los compuestos de nitrógeno alquilado pueden ser, también, compuestos de amonio secundario, terciario o cuaternario en los que todos los hidrógenos de amina se han reemplazado por sustituciones de radicales orgánicos. Para las aminas secundarias, terciarias y cuaternarias, los radicales sustituidos pueden ser alquilos, alquilarilos, arilos o etoxilos de cadena larga o corta. La segunda categoría de tensioactivos que contienen nitrógeno incluye materiales heterocíclicos tales como los derivados de piridinio, morfolinio e imidazolinio.

## ES 2 288 317 T3

TABLA 1

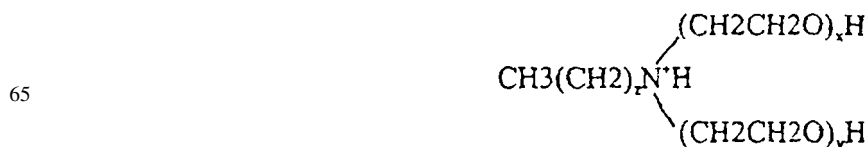
Tensioactivos iónicos analizados en aplicaciones de estabilización de enzimas	
DETERGENTES BIPOLARES	
Propanosulfonatos de amonio	Estabilización de enzimas
N-dodecil-n,n'-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Sigma Chem. Co. D-4516, Lote 95H50545)	-
N-octadecil-n,n'-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonato (Sigma Chem. Co. O-8004, Lote 44H5006)	-
N-decil-n,n'-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Sigma D-4266, Lote 26H5029)	+/-
N-tetradecil-n,n'-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Sigma Chem. Co. T-7763, Lote 96H5001)	-
Derivados colamino	
Chaps (Sigma Chem. Co. C-3023, Lote 86H5022)	+/-
Chapso (Sigma Chem. Co. C-3649, Lote 35H5065)	+/-
Derivados Betaína	
Mirataine CB (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ)	-
Mirataine BB (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ)	-
Mirataine CBR (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ)	-
Mirataine ACS (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ)	
Otras sales bipolares	
Miracare 2MHT (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ)	-
Miracare 2MCA (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ)	-
DETERGENTES CATIÓNICOS	
Aminas etoxiladas	
Tomah E-14-2 (Tomah Prod. Inc., Milton, WI)	-
Tomah E-14-5 (Tomah Prod. Inc., Milton, WI)	-
Tomah E-18-15 (Tomah Prod. Inc., Milton, WI)	+++
Tomah E-18-5 (Tomah Prod. Inc., Milton, WI)	+++

<b>Piridinas modificadas</b>		
5	Cloruro de cetilpiridinio (Sigma Chem. Co. C-9002, Lote 77H1047)	-
<b>Sales de alquilamonio</b>		
10	Bromuro de tetradecil-trimetil-amonio (Sigma Chem. Co. T4762)	
15	Bromuro de dimetil dioctadecil amonio (Sigma Chem. Co. D2779, Lote 105H1131)	-
<b>DETERGENTES ANIÓNICOS</b>		
<b>Tensioactivos similares al ácido cólico</b>		
20	Ácido Cólico (Sigma Chem. Co. C-1254, Lote 56H0339)	-
	Ácido Taurocólico (Sigma Chem. Co. T-4009, Lote 15H5001)	-
<b>Éteres de polioxietileno</b>		
	TRITON X-200 (Sigma Chem. Co. X-200, Lote 75H0989)	-
	TRITON W-30 (Sigma Chem. Co. W-30, Lote 18F0766)	-
30	TRITON X-301(Sigma Chem. Co. 301, Lote 13H7706)	-
	TRITON 770 (Sigma Chem. Co. 770, Lote 18FO768)	-
<b>Otros</b>		
35	Sulfosuccinato de dioctilo (Sigma Chem. Co. D-4422)	-

40 De acuerdo con esto, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona tensioactivos catiónicos que estabilizan la actividad de enzimas. Los tensioactivos catiónicos tienen un valor del índice del Equilibrio Hidrófilo-Lipófilo (HLB) de aproximadamente 11 a 16. El valor del índice HLB es un índice para correlacionar la estructura química de moléculas de tensioactivos con su actividad de superficie. El valor del índice HLB se puede calcular por varias fórmulas empíricas (Ver por ejemplo, Meyers, Surfactant Science and Technology, VCH Publishers Inc., New York, pp. 231-245 [1992], incorporado aquí como referencia). El valor del índice HLB para los tensioactivos 45 comerciales oscila en el intervalo de 0 a aproximadamente 70 o más. Los tensioactivos hidrófilos están en el extremo superior de la escala debido a su alta solubilidad en agua y a sus propiedades de solubilización, mientras que los tensioactivos con baja solubilidad en agua, que son buenos solubilizadores de agua en aceites, están en el extremo inferior de la escala.

50 En algunas formas de realización de la presente invención, los tensioactivos catiónicos son aminas etoxiladas, preferentemente. Las aminas etoxiladas contienen una cadena lateral alquilo hidrofóbica y uno o más grupos polioxietileno de cadena larga. La solubilidad acuosa de las aminas etoxiladas depende en un alto grado de la extensión de la alcoxilación y no siempre está provocada por la formación de sales. Las aminas polioxietiladas simples (aminas POE) 55 se preparan a partir de alquilaminas de cadena larga mediante etoxilación. La mayoría de las aminas etoxiladas son solubles en agua y son bases relativamente débiles. Las aminas etoxiladas se utilizan principalmente como agentes emulsiones y como agentes acondicionadores del cabello.

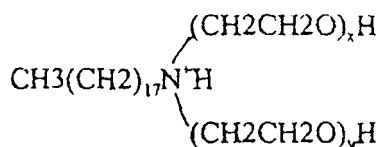
60 El tensioactivo catiónico se selecciona preferentemente entre el grupo de alquil aminas etoxiladas que tienen la siguiente estructura general en solución acuosa:



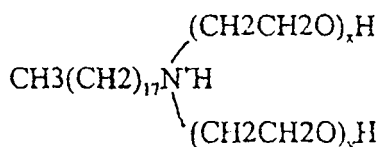
## ES 2 288 317 T3

en la que z es un número entero de aproximadamente 15 a 20 y en la que x e y son cada uno, al menos uno, y x+y tiene un valor medio de aproximadamente 5 a 15 de forma que el valor del índice HLB es de aproximadamente 11 a 16. El átomo de nitrógeno se puede reemplazar por un átomo de azufre para formar un alquil sulfuro etoxilado, un átomo de fósforo para formar una alquil fosfina etoxilada, o un átomo de arsénico para formar una alquil arsenina etoxilada.

Más preferentemente, el tensioactivo catiónico se selecciona entre el grupo que tiene en solución acuosa las estructuras:



en el que x+y tienen un valor medio de 5 y:



en el que x+y tiene un valor medio de 15.

### B. Utilización de tensioactivos catiónicos en tampones de almacenamiento y de reacción

Los tensioactivos catiónicos descritos anteriormente se pueden utilizar para estabilizar enzimas tanto en tampones de almacenamiento como en tampones de reacción. Estos tensioactivos son útiles para la estabilización de diversas enzimas que incluyen, pero no se limitan a, *Taq* polimerasa, *Tth* polimerasa, *Tfl* polimerasa, transcriptasa reversa de MMLV, transcriptasa reversa de AMV y ADN polimerasa de T4. En algunas formas de realización, las enzimas se pueden producir por recombinación o se pueden purificar de organismos nativos, como se conoce en la técnica. En otras formas de realización, las enzimas se pueden purificar en ausencia de tensioactivos mediante una columna de cromatografía, o se pueden purificar en presencia de tensioactivos distintos de los tensioactivos catiónicos de la presente invención, pudiéndose eliminar estos tensioactivos mediante cromatografía (Ver por ejemplo, M.P. Deutscher (ed.), *Methods in Enzymology-Guide to Protein Purification*, Academic Press Limited, London [1990]).

En algunas formas de realización de la presente invención, los tampones de almacenamiento de enzimas termoestables y de otras enzimas comprenden un reactivo de tamponamiento a una concentración de aproximadamente 10 a 70 mM (preferentemente aproximadamente 50 mM de Tris-HCl a pH 8,0), una sal a una concentración de aproximadamente 50 a 150 mM (preferentemente aproximadamente 100 mM de KCl o NaCl), un quelante a una relación molar respecto de la sal de aproximadamente 1:500 a 1:1500 (preferentemente aproximadamente 0,1mM EDTA), un agente reductor a una concentración de aproximadamente 1 a 10 mM (preferentemente aproximadamente 1mM de DTT (ditiotreitól)), glicerol a una concentración de aproximadamente el 50% en volumen y el tensioactivo catiónico de la presente invención a una concentración de aproximadamente 0,001% a 1,0% (preferentemente aproximadamente 0,1%).

En otras formas de realización de la presente invención, los tampones de reacción para las polimerasas termoestables y otras enzimas comprenden un reactivo de tamponamiento a una concentración de aproximadamente 5 a 15 mM (preferentemente aproximadamente 10 mM de Tris-HCl a un pH de aproximadamente 8,0 a 9,0 a 25°C), una sal monovalente a una concentración de aproximadamente 20 a 100 mM (preferentemente aproximadamente 50 mM de NaCl o KCl), un catión divalente a una concentración de aproximadamente 1,0 a 10,0 mM (preferentemente  $\text{MgCl}_2$ ), dNTP a una concentración, cada uno, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mM (preferentemente aproximadamente 0,2 mM de cada uno) y el tensioactivo catiónico de la presente invención a una concentración de aproximadamente 0,001 a 1,0% en volumen (preferentemente aproximadamente 0,1%).

Todavía, en formas de realización adicionales de la presente invención, los tampones de reacción de las ADN polimerasas termolábiles, tales como la ADN polimerasa de T4, comprenden un reactivo de tamponamiento a una concentración de aproximadamente 5 a 15 mM (preferentemente aproximadamente 10 mM de Tris-HCl a pH 8,0), una sal monovalente a una concentración de aproximadamente 30 a 70 mM (preferentemente aproximadamente 50 mM de NaCl), un catión divalente a una concentración de aproximadamente 5 a 15 mM (preferentemente aproximadamente 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), un agente reductor a una concentración de aproximadamente 0,5 a 5 mM (preferentemente aproximadamente 1 mM de DTT) y un tensioactivo catiónico a una concentración de aproximadamente 0,001 a 0,1% en volumen (preferentemente a aproximadamente 0,01% en volumen).

Todavía, en formas de realización adicionales de la presente invención, los tampones de reacción de las transcriptasas reversas, tales como la transcriptasa reversa de MMLV, comprenden un reactivo de tamponamiento a una concentración de aproximadamente 30 a 70 mM (preferentemente aproximadamente 50 mM de Tris-HCl a un pH de aproximadamente 8,3), un catión divalente a una concentración de aproximadamente 5 a 15 mM (preferentemente MgCl<sub>2</sub> a aproximadamente 7 mM), una sal monovalente a una concentración de aproximadamente 20 a 60 mM (preferentemente KCl a aproximadamente 40 mM), un agente reductor a una concentración de aproximadamente 1 a 20 mM (preferentemente DTT a aproximadamente 10 mM) y un tensioactivo catiónico a una concentración de aproximadamente 0,01 a 1,0% en volumen (preferentemente aproximadamente a 0,01% en volumen).

Existen muchos equivalentes de los componentes de reacción y de los tampones de almacenamiento descritos anteriormente y se pueden realizar sustituciones, fácilmente. Por tanto, se pretende que estos tampones preferidos sean sólo una guía para la preparación de los tampones en los que se pueden almacenar las enzimas y las polimerasas y de los tampones para llevar a cabo la polimerización y otras reacciones de las enzimas, y no pretenden limitar la presente invención. La presente invención está particularmente relacionada con la estabilización de las polimerasas, y con la estabilización de las proteínas en general.

## Experimentación

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas formas de realización y aspectos preferidos de la presente invención, y no se deben considerar como limitantes del ámbito de la misma.

En la revelación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: °C (grados Centígrados); pb (pares de bases); kb (kilopares de bases); kD (kilodaltons); g (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl (microlitros); µCi (microcurios); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); nM (nanomolar); U (unidades); PM (peso molecular), sec (segundos); min (s) (minuto/minutos); h (hora/horas); ac (anticuerpo); HCl (ácido clorhídrico); MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio); KCl (cloruro potásico); NaCl (cloruro sódico); PBS (solución salina tamponada con fosfato [150 mM NaCl, tampón 10 mM fosfato sódico, pH 7,2]); SDS (dodecil sulfato sódico); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); EDTA (ácido etilen diamino tetraácético); EGTA (ácido etilenglicol-bis(B-aminooetil éter) N,N,N',N'-tetraácético); HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico); p/v (peso por volumen); v/v (volumen por volumen); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney); AMV (virus de la mieloblastosis aviar); TR (Transcriptasa Reversa); *Taq* (*Thermus aquaticus*); *Tfl* (*Thermus flavus*); *Tth* (*Thermus thermophilus*).

### Ejemplo 1

#### Capacidad de la *Taq* polimerasa para amplificar un segmento de ADN en presencia o ausencia de detergente

Este ejemplo describe el desarrollo de un ensayo basado en PCR para la estabilización de una polimerasa por detergentes (esto es, tensioactivos). Se definieron condiciones en las que la polimerasa era incapaz de producir un producto de amplificación detectable en ausencia de detergente, pero en las que se podía producir amplificación detectable en presencia de un detergente estabilizante, tal como Tween 20.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de dNTP 2 mM	100 µl
2 ng/µl de pGEM luc	10 µl
Cebador A (1 µg/µl)	10 µl
Cebador B (1 µg/µl)	10 µl
Tampón 10 x <i>Taq</i>	100 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	100 µl
Agua nanopura	670 µl
<hr/>	
Total	1000 µl

El plásmido pGEM luc (Ref # E1541) y la solución 25mM de MgCl<sub>2</sub> (Ref # M1902) se obtuvieron de Promega Corp, Madison WI. La formulación del tampón 10 x *Taq* fue: 500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl (pH 9,0 a 25°C). El tampón 10 x *Taq* se preparó disolviendo KCl y Trizma en agua nanopura y ajustando el pH con ácido clorhídrico concentrado. El agua nanopura se preparó autoclavando agua destilada tratada mediante el sistema de tratamiento de agua NANOPURE. La mezcla de dNTP 2 mM se preparó mezclando soluciones madre 100 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega U120, U122, U121 y U123, respectivamente) con agua nanopura para producir una solución que contenía una concentración 2 mM de cada nucleótido. Las secuencias de ADN de los cebadores fueron TAATAC GACTCACTATAGGGCGAAT (ID SEQ No: 1) y GAATCGTCGTATGCATGTAAAACCTC (ID SEQ No: 2).

## ES 2 288 317 T3

Se añadieron cien microlitros de la mezcla de reacción en un tubo de 0,2 ml y se añadieron 50  $\mu$ l en cinco tubos adicionales. Se preparó otra mezcla de reacción utilizando la formulación descrita anteriormente excepto que se utilizaron 10  $\mu$ l de 10% (V/V) de Tween 20 (Sigma, P-1379) para reemplazar a 10  $\mu$ l de los 670  $\mu$ l de agua. Esta mezcla de reacción tenía una concentración final de detergente de 0,1% v/v de Tween 20. Esta segunda mezcla de reacción se añadió de forma que un tubo contenía 100  $\mu$ l de mezcla de reacción y cinco tubos más contenían 50  $\mu$ l de la mezcla.

Se añadió un microlitro de *Taq* polimerasa (10 U/ $\mu$ l), purificada sin la adición de ningún detergente en ninguna etapa, a las mezclas de reacción que contenían detergente y a las que estaban libres de detergente y se mezclaron los contenidos de los tubos. Se realizaron diluciones seriadas de las reacciones que contenían detergente y de las que estaban libres de él de la forma siguiente. Se retiraron cincuenta microlitros de la primera mezcla y se añadieron a 50  $\mu$ l de la misma mezcla de reacción, en uno de los cinco tubos restantes de mezcla de reacción. El contenido de este tubo se mezcló y 50  $\mu$ l de la mezcla resultante se transfirieron al tubo siguiente, con 50  $\mu$ l de mezcla de reacción. El mezclado y las transferencias se realizaron hasta que los cinco tubos que contenían mezcla de reacción se mezclaron con la mezcla de reacción que contenía la enzima. Los tubos se colocaron en un termociclador y se sometieron al siguiente programa.

Condiciones previas a los ciclos: Ajuste de la temperatura a 94°C durante 1 min y posterior realización de las condiciones del ciclo.

Condiciones del ciclo: Para cada ciclo: ajuste de la temperatura a 94°C durante 15 sec y posterior descenso de la temperatura a 65°C durante 2 min.

Repetición de las condiciones de temperatura del ciclo durante 25 ciclos. Realización de las condiciones posteriores a los ciclos.

Condiciones posteriores a los ciclos: Ajuste de la temperatura a 68°C durante 4 min y posterior descenso de la temperatura a 4°C.

Después de someter a los tubos a los ciclos según las condiciones del programa enumeradas anteriormente, se añadieron 5  $\mu$ l de solución de parada a cada tubo. La solución de parada contenía: 0,4% de SDS, 160 mM de EDTA, 0,16% de Naranja G y 24% de Glicerol.

Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. La agarosa (3 g) se añadió a un matraz que contenía 300 ml de tampón 1 x TBE. La solución se hirvió en un calentador de microondas y se mezcló el contenido del matraz. Posteriormente, se añadieron treinta microlitros de una solución de 10 mg/ml de bromuro de etidio y la agarosa fundida se vertió en un molde para gel con un peine para un Sistema de Electroforesis en Gel Horizontal BRL Modelo H4 y se dejó que se endureciera. Después de que se endureciera el gel, se quitó el peine y el molde para el gel se colocó en el lecho del sistema de electroforesis, que se había rellenado previamente con tampón 1 x TBE. Se cargaron muestras de veinticinco microlitros de cada reacción de amplificación, junto con una muestra del marcador pGEM, en pocillos individuales del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 2 horas utilizando una Fuente de Energía Hoffer PS500X DC, posteriormente se visualizó el gel bajo luz U.V. utilizando un sistema Ambis.

Se observó una banda intensa de ADN de 1,5 kb en el carril que contenía la muestra de la reacción de amplificación que tenía la cantidad más alta de *Taq* polimerasa y 0,1% de Tween 20. Se observaron bandas de 1,5 kb más débiles en los carriles que contenían la reacción de amplificación con el segundo nivel más alto de *Taq* polimerasa y 0,1% de Tween 20, y no se observó la banda de 1,5 kb en el carril que contenía el nivel más alto de *Taq* polimerasa sin la adición de detergente.

Así, estas condiciones son útiles para analizar la capacidad de los detergentes para estabilizar a la *Taq* polimerasa durante las reacciones de amplificación. Los materiales que estabilizan a la enzima incrementan la intensidad de la banda de ADN de 1,5 kb producida en la reacción respecto de la producida en las reacciones sin detergente. Los materiales estabilizantes excepcionalmente buenos se identificaron como aquellos que permitían la producción de una banda de ADN de 1,5 kb a concentraciones de enzima más bajas que aquellas observadas cuando se utilizaba 0,1% de Tween 20.

### Ejemplo 2

#### 60 *Cribado de los tensioactivos*

En este ejemplo, se cribaron los tensioactivos por su capacidad para estabilizar enzimas. Los siguientes compuestos se disolvieron en agua nanopura hasta una concentración final del 10% (bien p/v o bien v/v dependiendo de si el material era un sólido o un líquido, respectivamente): Bromuro de tetradecil-trimetil-amonio (Sigma T4762), Sulfosuccinato de dioctilo (Sigma D-4422), Ácido Cólico (Sigma C-1254, lote 56H0339), Ácido Taurocólico (Sigma T-4009, lote 15H5001), Chaps (Sigma C-3023, lote 86H5022), Chaps (Sigma C-3649, lote 35H5065), Cloruro de cetilpiridinio (Sigma C-9002, lote 77H1047), Tween 20 (Sigma P-1379) y TRITON X-100.

## ES 2 288 317 T3

Se preparó un tampón 10X con cada una de estas soluciones de tensioactivo. El tampón 10X para cada uno estaba constituido por: 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl pH 9,0 (a 25°C), 1% de tensioactivo (preparado mediante una dilución 1:10 de la solución de detergente descrita anteriormente en tampón durante la formulación). Como se describe en el Ejemplo 1, la *Taq* polimerasa utilizada en estos experimentos se purificó sin exposición a ningún detergente. Cada una de estas soluciones de tampón se utilizó para formular una solución de *Taq*-tensioactivo de la manera siguiente:

Agua nanopura	255 $\mu$ l
Tampón de tensioactivo 10X	32 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	32 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Volumen total	320 $\mu$ l

Se preparó una solución control como se indicó anteriormente, excepto que se utilizaron 32  $\mu$ l de tampón 10X sin tensioactivo. Las soluciones se incubaron a 95°C y se retiraron muestras (10  $\mu$ l) a 0, 5, 10, 30, 60, 90 y 120 min, se colocaron en un tubo nuevo y se mantuvieron en hielo. Posteriormente, se analizó la actividad *Taq* polimerasa de las muestras.

La actividad *Taq* polimerasa se determinó midiendo la cantidad de base desoxinucleótido tritiado que una muestra de enzima podía incorporar. El ensayo se realizó como sigue. Las soluciones de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega U120, U122, U121 y U123, respectivamente) se diluyeron hasta una concentración final 2 mM (originalmente a 100 mM) utilizando agua nanopura. El nucleótido tritiado <sup>3</sup>H-TTP se obtuvo de Amersham (TRK424, 250  $\mu$ Ci/250  $\mu$ l). El molde para la incorporación fue ADN de timo de ternera (Sigma, D-1501) disuelto en 10 mM de Tris-HCl pH 7,3, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 2,5 mg/ml. Antes de su utilización, el ADN se trató con 1  $\mu$ l de una dilución 1:10 de ADNasa RQ1 (Promega M610) (dilución preparada utilizando 10 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>) e incubada durante 10 min a 37°C, seguido por 30 min a 68°C. Esto se realizó para “activar” el ADN para la incorporación. Se preparó un tampón de análisis 10X *Taq* que contenía 500 mM de Tris-HCl (pH 9,0 a 25°C), 500 mM de NaCl y 100 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Tampón de análisis <i>Taq</i> 10X	500 $\mu$ l
Agua nanopura	1700 $\mu$ l
dATP (2 mM)	500 $\mu$ l
dCTP (2 mM)	500 $\mu$ l
dGTP (2 mM)	500 $\mu$ l
dTTP (2 mM)	500 $\mu$ l
ADN de timo de ternera activado	600 $\mu$ l
<sup>3</sup> H-TTP (1 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l

A distintos tiempos se añadieron muestras (10  $\mu$ l) a 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se incubaron posteriormente a 74°C durante 10 min. Después de la incubación, la solución se diluyó con 500  $\mu$ l TCA al 10% enfriado en hielo. La solución de TCA se filtró a través de un filtro GF/A. El tubo se lavó tres veces con 1 ml TCA al 5% y el líquido de lavado se filtró posteriormente con el mismo filtro. Posteriormente, el filtro se aclaró 3 veces con TCA al 5% y posteriormente se aclaró con acetona. Los filtros se secaron durante 10 min con una lámpara de calor y posteriormente se contó la radiactividad. El porcentaje de actividad presente en cualquier punto de tiempo se determinó dividiendo las cuentas netas de la muestra a ese tiempo entre las cuentas netas de la muestra a tiempo 0 min, para cada solución de enzima y multiplicando posteriormente por 100%. El porcentaje de actividad de la solución se representó frente al tiempo. Los puntos se conectaron posteriormente mediante una curva ajustada y la semivida estimada de la enzima bajo las condiciones elegidas, se estimó en base al punto en el que la línea cortaba el 50% de actividad.

Posteriormente se determinó el porcentaje de actividad que quedaba a los diferentes tiempos, y se representó para estimar la semivida de la enzima en presencia de estos tensioactivos. Estos resultados indicaron que las soluciones de tensioactivo iónico que contenían Chaps y Chapso tenían semividas estimadas de aproximadamente 5 min. Las soluciones de tensioactivo no iónicos que contenían Tween 20 y TRITON X-100 tenían semividas de aproximadamente 40 min. La solución control sin tensioactivo tenía una semivida inferior a 5 min. Todas las otras soluciones de tensioactivos iónicos tenían semividas inferiores a 5 min.

Así, este ensayo es útil para identificar tensioactivos iónicos que proporcionan algún grado de estabilización a la *Taq* polimerasa, como se ha visto con Chaps y Chapso. Además, este ensayo se puede utilizar para identificar tensioactivos iónicos que sean buenos estabilizantes de la *Taq* polimerasa. Estos tensioactivos aumentan la semivida de la *Taq* polimerasa, bajo estas condiciones, hasta un valor aproximadamente igual o mayor que el observado con Tween 20.

## ES 2 288 317 T3

### Ejemplo 3

#### *Cribado de tensioactivos adicionales*

5 En este ejemplo, se analizó la capacidad para estabilizar proteínas de tensioactivos adicionales. Se prepararon soluciones (10% p/v o v/v) en agua nanopura de los siguientes materiales: N-dodecil-n,n'-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Sigma D-4516, lote 95H5045), Mega 10 (Sigma D-6277, lote 37H5041), N-octadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonato (Sigma O-8004, lote 44H5006), SB 3-10, N-Tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Sigma T-7763, lote 96H5001), Bromuro de dimetil dioctadecil amonio, TRITON X-200 (Sigma X200, lote 75H0989), TRITON W-30 (Sigma Chem. Co., W-30, lote 18F0766), TRITON X-301 (Sigma X301, lote 13H7706), TRITON 770 (Sigma 770, lote 18F0768).

15 Alícuotas de noventa y nueve microlitros de la mezcla de reacción maestra, descrita en el Ejemplo 1, se colocaron en tubos separados de 0,2 ml, posteriormente se añadieron, a cada tubo, 1  $\mu$ l de las soluciones de tensioactivo al 10% y 2  $\mu$ l de *Taq* polimerasa (10 U/ $\mu$ l), purificada en ausencia de detergente. Las reacciones control consistieron en tubos que contenían 1  $\mu$ l de Tween 20 al 10% (control positivo) y sin tensioactivo (control negativo). Los tubos se sometieron a las condiciones de amplificación y al protocolo de análisis por gel del Ejemplo 1 anterior.

20 Se produjo una banda intensa de ADN de 1,5 kb en la reacción suplementada con Tween 20, y se produjo una banda más débil, pero visible, en la reacción sin detergente añadido. El resto de las reacciones no produjeron un fragmento de ADN de 1,5 kb visible, excepto la reacción suplementada con N-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato. Esta reacción produjo una banda intermedia en intensidad entre la observada en la reacción sin detergente (control negativo) y la reacción suplementada con Tween 20.

25 Se prepararon un segundo grupo de reacciones en las que se colocaron 95  $\mu$ l de la mezcla de reacción maestra en tubos con 5  $\mu$ l de las soluciones de tensioactivo y 2  $\mu$ l de *Taq* polimerasa (10 U/ $\mu$ l). También, se prepararon controles con Tween 20 y sin tensioactivo. Las reacciones se realizaron de acuerdo a las condiciones de amplificación y se analizaron por electroforesis en gel, como se describió anteriormente.

30 Se observó una banda intensa de ADN de 1,5 kb en la reacción suplementada con Tween 20 y no se observó ninguna banda en la reacción sin tensioactivo. Ninguna de las otras reacciones produjo un fragmento de ADN de 1,5 kb visible, incluso la reacción suplementada con N-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato. Estos resultados indican que ninguno de estos tensioactivos es equivalente al Tween 20 como un agente estabilizante de *Taq* polimerasa.

### 35 Ejemplo 4

#### *Cribado de tensioactivos adicionales*

40 En este ejemplo se analizó la capacidad para estabilizar proteínas de tensioactivos adicionales. Se prepararon soluciones (10% p/v o v/v) en agua nanopura de los siguientes materiales: Miracare ZMHT, Miracare ZMCA, Mirataine BB, Mirataine ACS, Mirataine CBR y Mirataine CB (Rhone-Poulenc, North American Chemicals, Cranbury, NJ). Se analizaron soluciones del 0,1% de tensioactivo, como se describe en el Ejemplo 3, comparando con Tween 20 y con reacciones control sin tensioactivo, con la excepción de que la concentración de enzima se decreció a 10U de *Taq* por 45 100  $\mu$ l de mezcla de reacción.

50 Se observó una banda intensa de ADN de 1,5 Kb en la reacción suplementada con Tween 20 y no se observó banda en la reacción sin tensioactivo. El resto de las reacciones no produjo un fragmento visible de ADN de 1,5 Kb. Estos resultados indican que ninguno de estos tensioactivos es equivalente al Tween 20 como agente estabilizante de *Taq* polimerasa.

### Ejemplo 5

#### 55 *Evaluación inicial de los tensioactivos Tomah*

En este ejemplo se analizó la capacidad de aminas etoxiladas para estabilizar proteínas. Se prepararon soluciones (10% p/v o v/v) en agua nanopura de los siguientes materiales: Tomah E-14-2, Tomah E-14-5, Tomah E-18-15 y Tomah E-18-5 (Tomah Prod. Inc., Milton WI). Se analizaron soluciones del 0,1% de tensioactivo y se evaluaron, como se describe en el Ejemplo 3, comparando con Tween 20 y con reacciones control, con la excepción de que la concentración de enzima se decreció a 10U de *Taq* por 100  $\mu$ l de mezcla de reacción.

65 Se observó una banda intensa de ADN de 1,5 Kb en las reacciones suplementadas con Tween 20, Tomah E-18-15 y Tomah E-18-5. Las reacciones suplementadas con Tomah E-14-2 y Tomah E-14-5 no produjeron un fragmento de ADN de 1,5 kb visible. Estos resultados indican que Tomah E-18-15 y Tomah E-18-5 estabilizan a la *Taq* polimerasa, y que Tomah E-14-2 y Tomah E-14-5 no. Además, Tomah E-18-5 y Tomah E-18-15 parecen estabilizar a la enzima de forma, aproximadamente, igual de efectiva que Tween 20. Así, se realizaron análisis adicionales con estos tensioactivos.

## ES 2 288 317 T3

A todos los detergentes Tomah se les ha dado la descripción química de aminas etoxiladas, y son detergentes catiónicos. Sin embargo, difieren en su valor del índice HLB, tal como se define en McCutcheon's Volumen 1: Emulsifiers and Detergents North American Edition, 1996. Los valores HLB para estos materiales, y para algunos detergentes no iónicos que estabilizan a la *Taq* polimerasa, se muestran en la Tabla 2. Estos resultados sugieren que los detergentes catiónicos con índices HLB en el intervalo de 11-16, son efectivos en la estabilización de la *Taq* polimerasa.

TABLA 2

Detergentes	Índice HLB
Tomah E-14-2	8,3
Tomah E-15-5	5,0
Tomah E-18-5	11,0
Tomah E-18-15	16,0
TRITON X-100	13,5
Tween 20	16,7

### Ejemplo 6

#### *Análisis adicional de aminas etoxiladas*

Los resultados iniciales observados con los tensioactivos Tomah E-18 sugieren que estos materiales podrían estabilizar a la *Taq* polimerasa, al menos, tan bien como los detergentes no iónicos. Con el fin de obtener una idea más precisa de cómo funcionan estos materiales, se realizaron experimentos con niveles inferiores de enzima y detergente.

Se prepararon mezclas de reacción con un contenido de 0,1%, 0,01% y 0,001% de Tween 20, Tomah E-18-15 y Tomah E-18-5, como se describe en el Ejemplo 3 anterior. La *Taq* polimerasa, sin detergente, se añadió a estas mezclas para formar reacciones que contenían 10; 5; 2,5 y 1,25 U de *Taq* polimerasa por reacción. Las reacciones se incubaron en un termociclador y los productos de reacción se analizaron como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

Casi todos los carriles contenían el fragmento de ADN de 1,5 kb esperado. En la mayoría de los casos, fue difícil determinar si algún carril con uno de los detergentes tenía una banda más intensa que los carriles con los otros detergentes. Sin embargo, cuando había niveles inferiores de enzima y/o de detergente, las reacciones que contenían detergentes iónicos parecían producir más producto que las reacciones que contenían detergentes no iónicos.

### Ejemplo 7

#### *Mejora de la semivida de la *Taq* polimerasa en condiciones de incubación de alta temperatura en presencia de detergentes iónicos*

En este ejemplo se examinó la capacidad de las aminas etoxiladas para estabilizar a proteínas termoestables a altas temperaturas. Se prepararon soluciones de *Taq* polimerasa, sin detergente, (2,5 U/100  $\mu$ l de solución) que contenían 0,005% de Tomah E-18-15, Tomah E-18-5, Tween 20, NP-40 y TRITON X-100, como en el Ejemplo 2. Estas soluciones se incubaron a 95°C y se retiraron muestras a 0, 10, 30, 60 y 120 min y se analizaron como en el Ejemplo 2. Se estimaron gráficamente las semividas de la enzima en presencia de estos tensioactivos. La semivida de la *Taq* polimerasa en las soluciones que contenían Tomah E-18-5, TRITON X-10 y NP-40 era de aproximadamente 8 min. La solución que contenía Tween 20 tenía una semivida de 50 min, y la solución que contenía Tomah E-18-15 tenía una semivida estimada de 70 min. Estos resultados indican que estos dos tensioactivos catiónicos estabilizan a la *Taq* polimerasa, en condiciones de alta temperatura, tan bien como o mejor que los tensioactivos no iónicos utilizados normalmente para estabilizar a la enzima.

### Ejemplo 8

#### *Utilización de detergentes iónicos para mejorar el funcionamiento de la *Tth* polimerasa*

Después de comprobar que Tomah E-18-5 y Tomah E-18-15 mejoraban el funcionamiento de la *Taq* polimerasa, se realizaron experimentos adicionales para determinar si se podía demostrar este efecto con otras enzimas. En este experimento, se examinó la estabilización de la polimerasa termoestable *Tth* en presencia de tensioactivos catiónicos y no iónicos.

## ES 2 288 317 T3

Se prepararon muestras de 10 ml, en triplicado, de las siguientes soluciones:

5	2M Tris-HCl pH 7,5	50 $\mu$ l
	3M KCl	1 ml
	1M DTT	10 $\mu$ l
	0,5 M EDTA, pH 8,0	2 ml
	Albúmina de suero bovino (10 mg/ml)	500 $\mu$ l
10	Glicerol	5 ml
	Solución madre de tensioactivo	2 ml
	Agua nanopura	hasta 10 ml

15 La solución A contenía 2 ml de una solución madre al 10% de TRITON X-100; la solución B contenía 1 ml de una solución madre al 10% de Tween 20 y 1 ml de una solución madre al 10% de NP40; la solución C contenía 2 ml de una solución madre al 10% de Tomah E-18-15. Se mezcló una muestra de *Tth* polimerasa (Promega M210, lote 8502201) con volúmenes iguales de cada una de estas soluciones, para producir tres soluciones de enzima y detergente que contenían 2,5 U/ $\mu$ l de *Tth* polimerasa. Se preparó una mezcla de reacción como se describió, utilizando los materiales del Ejemplo 1, excepto que se utilizó un nuevo tampón 10X. Este tampón se preparó mezclando 1,67  
20 ml de 3M KCl, 0,5 ml de 2M Tris-HCl, pH 8,3 (25°C) y 7,83 ml de agua nanopura. Se añadieron cuatro microlitros de cada solución de enzima y detergente a 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se mezclaron. Se retiraron cien microlitros de esta solución, se mezclaron con otros 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se retiraron otros 100  $\mu$ l de la mezcla. Esta mezcla se añadió posteriormente a unos segundos 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se mezcló. Este proceso continuó hasta que se prepararon 6 tubos que contenían mezcla de reacción y 5; 2,5; 1,25; 0,625, 0,3125, y 0,156 unidades de  
25 *Tth* polimerasa. Se realizaron ciclos de temperatura como los descritos en el Ejemplo 1. Los productos de reacción se analizaron posteriormente como se describió en el Ejemplo 1.

30 Se observó una banda clara de 1,5 kb en los carriles fraccionados a partir de la enzima estabilizada con TRITON X-100, que tenían 5; 2,5 y 1,25 unidades de enzima. Se observó una banda clara de 1,5 kb en los carriles utilizados para analizar la enzima estabilizada con Tween 20 y NP40, que tenían 5; 2,5; 1,25 y 0,625 unidades de enzima. Se observó una banda clara de 1,5 kb en todos los carriles utilizados para analizar las reacciones de enzima estabilizada con Tomah E-18-15, excepto en la reacción de 0,156 unidades.

35 Estos resultados indican que el detergente iónico Tomah E-18-15 mejora el funcionamiento de la *Tth* polimerasa y que el grado de mejora es mayor que el observado con los detergentes no iónicos utilizados en este estudio. Esto es particularmente interesante ya que esta enzima es tanto transcriptasa reversa como ADN polimerasa, lo que indica que los detergentes de la presente invención son útiles para estabilizar estos dos tipos de enzimas.

### 40 Ejemplo 9

#### *Funcionamiento mejorado de la ADN polimerasa de T4 utilizando detergentes iónicos*

45 Ya que Tomah E-18-15 mejoraba el funcionamiento de dos ADN polimerasas termoestables, una de ellas con actividad transcriptasa reversa, se analizó su efecto en la actividad de una ADN polimerasa no termoestable (esto es, la ADN polimerasa de T4).

Se preparó la siguiente solución

50	Agua nanopura	960 $\mu$ l
	Tampón 10X*	200 $\mu$ l
	Mezcla de dNTP 2 mM	200 $\mu$ l
	ADN activado	200 $\mu$ l
55	$^3$ H-TTP (1 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	40 $\mu$ l

\*El tampón 10X de este ejemplo contenía 1 ml de 5M NaCl, 0,5 ml de 2M Tris-HCl pH 8,0 (25°C), 1 ml de 1M MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ l de 1M DTT, ajustado hasta un volumen final de 10 ml por la adición de agua nanopura. La mezcla de dNTP 2 mM se preparó como en el Ejemplo 1.  
60

La ADN polimerasa de T4 (Promega M421) se diluyó 1:100 en tampón 1X. Las reacciones se prepararon en hielo, como se muestra en la Tabla 3.

65

## ES 2 288 317 T3

TABLA 3

Componentes	Número de reacción					
	1 y 2	3 y 4	5	6	7	8
0,1% de Tomah E-18-15	0	0	0,5	5	0	0
1% de Tomah E-15-18	0	0	0	0	2,5	5
Agua nanopura	10	5	4,5	0	2,5	0
ADN polimerasa de T4 diluida	0	5	5	5	5	5
Mezcla de reacción	40	40	40	40	40	40

Los tubos se incubaron a 37°C durante 15 min, y se midió la cantidad de cuentas precipitadas con TCA para determinar la actividad de la enzima con estos niveles de tensioactivo. Los datos se muestran en la Tabla 4. Estos resultados indican que esta enzima es aproximadamente el 79% y el 68% más activa en presencia de 0,001% y 0,01% de tensioactivo, respectivamente.

TABLA 4

Reacción	Cuentas/min
1	136
2	202
3	4568
4	4916
5	8358
6	7864
7	5106
8	4720

Con el fin de confirmar estos resultados, y para determinar si el tensioactivo puede incrementar la actividad de esta enzima en presencia de BSA, se realizó el siguiente experimento. Se prepararon dos mezclas de reacción como se describió anteriormente, excepto que el tampón de reacción 10X de una de las mezclas (esto es, la mezcla +BSA) se realizó utilizando 1,7 ml de 10 mg/ml de BSA con el correspondiente descenso en la cantidad de agua nanopura utilizada para ajustar el volumen de la solución de componentes hasta 10 ml. Se prepararon dos grupos de reacciones, en hielo, como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5

Componente	Número de reacción		
	1 y 2	3, 4 y 5	6, 7 y 8
0,1% de Tomah E-18-15 (μl)	0	0	5
Agua nanopura (μl)	10	5	0
ADN polimerasa de T4 (μl)	0	5	5
Mezcla de reacción (μl)	40	40	40
* La ADN polimerasa de T4 se diluyó de nuevo 1:100 con tampón 1X como anteriormente.			
** Se utilizó una mezcla de reacción para cada grupo de tubos, de forma que un grupo contenía BSA y el otro no.			

## ES 2 288 317 T3

Los tubos se incubaron durante 15 min a 37°C y se midió la cantidad de cuentas precipitada con TCA para determinar la actividad de la enzima en estas soluciones. Los datos se presentan en la Tabla 6. Estos resultados indican que: 1) el detergente iónico mejora la actividad de esta polimerasa termolábil; 2) el aumento de actividad es similar al observado con la adición de BSA, un material conocido por ayudar a la enzima a mantener su actividad tras su dilución; 3) aumento de actividad observado con el tensioactivo es ligeramente mayor que el observado con BSA, por separado; y 4) la actividad de la enzima en presencia de estos dos materiales es ligeramente superior a la observada con la adición de BSA sola.

TABLA 6

Número de reacción	Cuentas/min (reacciones sin BSA)	Cuentas/min (reacciones con BSA)
1	210	434
2	154	420
3	4124	6338
4	4488	6332
5	4502	6328
6	6762	6678
7	6500	6100
8	6894	7752

### Ejemplo 10

#### *Funcionamiento mejorado de la transcriptasa reversa de MMLV tras la adición de un detergente iónico*

Ya que el detergente iónico Tomah E-18-15 mejoraba el funcionamiento de una enzima termoestable con actividad de transcriptasa reversa (*Th* polimerasa), se examinó el efecto de este tensioactivo en otra transcriptasa reversa, la MMLV-TR.

Se preparó un tampón de reacción 10X MMLV-TR de la forma siguiente:

2M Tris-HCl pH 8,3 (a 25°C)	2,5 ml
1M MgCl <sub>2</sub>	0,7 ml
3M KCl	1,33 ml
1M DTT	1 ml
Agua nanopura	hasta un volumen final de 10 ml

Se realizó una mezcla de ensayo de la forma siguiente:

Componente	Cantidad
Tampón de reacción 10X MMLV	500 $\mu$ l
Agua nanopura	3200 $\mu$ l
100 mM dTTP	25 $\mu$ l
Poli rA/Oligo dT*	1250 $\mu$ l
<sup>3</sup> H-dTTP	25 $\mu$ l

El PoliA/Oligo dT (Supertech, cat # 111020A era 1mM poli-A, 0,1 mM Oligo dT. Se diluyó una muestra de MMLV-TR (Promega M170, lote n° 8157702) 1:100 con tampón de ensayo. Las reacciones se prepararon en hielo como se indica en la Tabla 7.

ES 2 288 317 T3

TABLA 7

Componentes	Número de reacción		
	1 y 2	3 y 4	5 y 6
0,25% de Tomah E-18-15 ( $\mu$ l)	0	0	2
MMLV-TR diluida 1: 100	0	2	2
Mezcla de ensayo	50	50	50

Estas reacciones se incubaron durante 10 min a 37°C, se añadieron 10  $\mu$ l de ADN de timo de ternera 1mg/ml y 0,5 ml al 10% de TCA y los tubos se colocaron en hielo durante 10 min. Posteriormente, se filtraron las reacciones utilizando filtros GF/C y los filtros se lavaron y se contaron. Los datos se presentan en la Tabla 8. Estos datos indican que hay un incremento en el funcionamiento de la transcriptasa reversa cuando está estabilizada con un detergente iónico, en las condiciones mostradas anteriormente.

TABLA 8

Actividad MMLV-TR	
Reacción	Cuentas/min
1	74
2	128
3	2836
4	2960
5	5056
6	4400

Ejemplo 11

*Funcionamiento mejorado de la transcriptasa reversa AMV tras la adición de un detergente iónico*

Ya que el detergente iónico Tomah E-18-15 mejoraba el funcionamiento de la transcriptasa reversa MMLV (Ejemplo 10), se examinó el efecto de este tensioactivo en otra transcriptasa reversa, la AMV-TR, siguiendo el procedimiento detallado en el Ejemplo 10. Estos datos (ver Tabla 9) indican que el funcionamiento de la transcriptasa reversa AMV aumentaba cuando se ensaya con un detergente iónico bajo las condiciones de reacción detalladas en el Ejemplo 10.

TABLA 9

Mejora de la actividad de AMV-TR con un tensioactivo catiónico		
Reacción	Cuentas/min Muestra A	Cuentas/min Muestra B
Sin tensioactivo/sin AMV-TR	34	56
Sin tensioactivo/con AMV-TR	1950	4444
0,01% de Tomah E-18-15 y AMV-TR	3386	9401
Porcentaje de mejora en presencia de 0,01% de Tomah E-18-15	75	112

## ES 2 288 317 T3

### Ejemplo 12

#### *Funcionamiento mejorado de la ADN polimerasa *Tfl* tras la adición de un detergente iónico*

5 Las soluciones de *Tfl* polimerasa, sin detergente, se analizaron en una reacción de PCR en presencia del detergente Tomah E-18-15. La primera reacción contenía 0,1% del detergente y 5 unidades de *Tfl* polimerasa. Se realizaron una serie de reacciones de PCR, preparadas a partir de diluciones seriadas 1:2 de la primera reacción, hasta una reacción final que contenía 0,003% de detergente y 0,15 unidades de *Tfl* polimerasa. Se realizó también un control sin detergente. El producto de PCR resultante se analizó en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, y visualizado  
10 utilizando luz UV.

Los datos se presentan en la Tabla 10. En ausencia de detergente, la *Tfl* polimerasa no generó ningún producto de PCR visible después de 25 ciclos. En presencia de Tomah E-18-15, un producto de PCR era visiblemente detectable cuando se utilizaban de 5 unidades a 0,039 unidades de *Tfl* en presencia de 0,1% a 0,0005% de detergente.  
15

TABLA 10

<b>Funcionamiento mejorado de la <i>Tfl</i> polimerasa</b>			
<b>Reacción</b>	<b>Tomah E-18-15 (%)</b>	<b><i>Tfl</i> polimerasa (unidades)</b>	<b>Banda en gel</b>
1	0,1	5	+
2	0,05	2,5	+
3	0,025	1,25	+
4	0,0125	0,625	+
5	0,006	0,312	+
6	0,003	0,156	+
7	0,0015	0,078	+
8	0,0005	0,039	+
9	0,0003	0,020	-
10	ninguna	5	-

**REIVINDICACIONES**

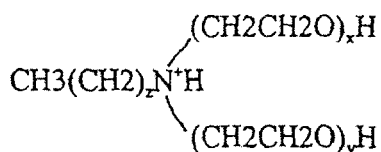
1. Una composición que comprende:

- a) una polimerasa purificada; y
- b) un tensioactivo catiónico,

en el que dicho tensioactivo catiónico tiene un valor del índice HLB de aproximadamente 11-16

2. La composición de la Reivindicación 1, en la que dicho tensioactivo catiónico es una amina polietoxilada.

3. La composición de la Reivindicación 2, en la que dicha amina polietoxilada tiene la estructura molecular:



en la que z es un número entero de 15 a 20 y x+y tiene un valor medio de 5 a 15.

4. La composición de la Reivindicación 2, en la que dicha amina polietoxilada está en una concentración del 0,0005 por ciento al 1,0 por ciento en volumen.

5. La composición de la Reivindicación 4, en la que z es 18 y x+y tiene un valor medio de 5.

6. La composición de la Reivindicación 4, en la que z es 18 y x+y tiene un valor medio de 15.

7. La composición de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente un tampón en una concentración de aproximadamente 10 mM a 70 mM.

8. La composición de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente una sal seleccionada entre el grupo constituido por NaCl y KCl.

9. La composición de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente una sal divalente seleccionada entre el grupo constituido por MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>.

10. La composición de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente un quelante.

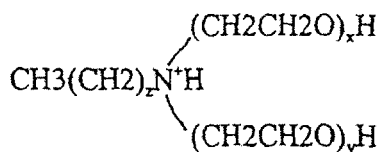
11. La composición de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente un agente reductor.

12. Una composición que comprende

- a) una polimerasa;
- b) un tensioactivo amina polietoxilada, en el que dicha amina polietoxilada tiene un valor del índice HLB de aproximadamente 11-16; y
- c) un tampón.

13. La composición de la Reivindicación 12, en la que dicha amina polietoxilada está en una concentración del 0,0005% al 1,0 por ciento en volumen.

14. La composición de la Reivindicación 12, en la que dicha amina polietoxilada tiene una estructura molecular:



en la que z es un número entero de 15 a 20 y x+y tiene un valor medio de 5 a 15.

## ES 2 288 317 T3

15. La composición de la Reivindicación 14, en la que z es 18 y x+y tiene un valor medio de 5.

16. La composición de la Reivindicación 4, en la que z es 18 y x+y tiene un valor medio de 15.

5 17. La composición de la Reivindicación 12, en la que dicha polimerasa se selecciona entre el grupo constituido por transcriptasa reversa, ADN polimerasa y una polimerasa que es a la vez transcriptasa reversa y ADN polimerasa.

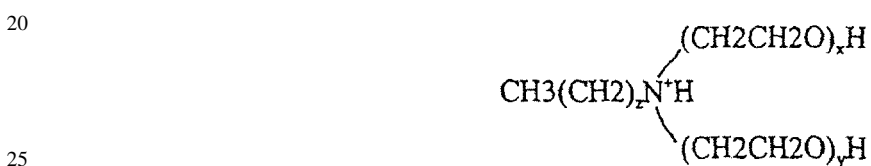
18. Un procedimiento que comprende:

10 a) proporcionar una polimerasa purificada que tiene actividad y un tensioactivo catiónico; en el que dicho tensioactivo catiónico tiene un valor del índice HLB de aproximadamente 11-16; y

b) combinar dicha polimerasa y dicho tensioactivo para formar una mezcla, bajo condiciones en las que se estabiliza dicha actividad de dicha polimerasa.

15 19. El procedimiento de la Reivindicación 18, en el que dicho tensioactivo catiónico es una amina polietoxilada.

20. El procedimiento de la Reivindicación 19, en el que dicha amina polietoxilada tiene la estructura molecular:



en la que z es un número entero de 15 a 20 y x+y tiene un valor medio de 5 a 15.

30 21. El procedimiento de la Reivindicación 20, en el que z es 18 y x+y tiene un valor medio de 5.

22. El procedimiento de la Reivindicación 20, en el que z es 18 y x+y tiene un valor medio de 15.

35

40

45

50

55

60

65