



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 561**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99903891 .2**

96 Fecha de presentación : **08.02.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1053350**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2000**

54 Título: **Métodos para amplificar y secuenciar ADN.**

30 Prioridad: **10.02.1998 IL 123256**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2009

73 Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
The Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
Rehovot 76100, IL

72 Inventor/es: **Lapidot, Aviva;**
Iakobashvili, Robert y
Malin, Gennady

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 323 561 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

Métodos para amplificar y secuenciar ADN.

5 La presente invención se refiere a un método para realizar la extensión ciclada del cebador sobre un ADN molde, y más particularmente a métodos que incluyen una etapa de extensión del cebador tal como una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de nucleótidos que comprende realizar dicha PCR y reacciones de secuenciación en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina (denominado en lo sucesivo "THP(B)"), 2-metil-4-carboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina (denominado en lo sucesivo "THP(A)") y mezclas de los mismos, para mejorar el rendimiento y la especificidad de dichas reacciones. La invención además se refiere a kits que comprenden prolina, THP(B), THP(A), o mezclas de los mismos para uso en la amplificación por PCR y en la secuenciación en ciclo del nucleótido.

15 La extensión del cebador sobre un ADN molde es una etapa común en algunas de las técnicas más usadas y poderosas en la biología molecular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una de estas técnicas, es un medio rápido, barato y sencillo de producir cantidades de ADN en microgramos a partir de cantidades minúsculas de materiales fuente. Ahora se han descrito y aplicado a un rango de disciplinas muchas variaciones sobre el procedimiento base.

20 En medicina, el impacto principal de la PCR está en el diagnóstico y escrutinio de enfermedades genéticas y el cáncer, la rápida detección de micobacterias y VIH, la detección de enfermedad mínima residual en leucemia, y el tipado de HLA. La técnica de PCR también es útil en patología forense y en biología de la evolución, juega un papel central en el proyecto del genoma humano y se usa de forma rutinaria en procesos de biología molecular (McPherson *et al.*, 1992).

25 Sin embargo, el uso práctico de la tecnología de PCR muestra de forma frecuente dificultades y limitaciones. La necesidad de convertir la fuente de ADN originalmente doble y luego los productos de ADN de hebra doble en moldes de una sola hebra en todos los ciclos de amplificación normalmente se logra por desnaturalización térmica del ADN a 93-95°C. La desnaturalización del ADN depende enormemente de su composición nucleica base. Un alto contenido en GC hace muy difícil la amplificación y la secuenciación del ADN, debido a la elevada temperatura de fusión y a la estable estructura secundaria del motivo ampliado. Un resultado común de amplificar una región que contiene un motivo repetido con un alto contenido en GC es la presencia de productos de amplificación adicionales, que no corresponden con el producto deseado (Varadaraj y Skinner, 1994). Además, la desnaturalización incompleta permite a las hebras de ADN soltarse y retroceder rápidamente o recolocarse ("snap-back"), dando lugar a una disminución en el rendimiento del producto. Las etapas de desnaturalización que se realizan durante largos periodos de tiempo y/o una alta temperatura dan lugar a pérdida innecesaria de actividad de la enzima y descomposición de los dNTP.

30 La ADN polimerasa Taq, normalmente usada en protocolos de PCR, puede resistir una exposición repetida a la alta temperatura (94-95°C) requerida para la típica separación de hebras de ADN, y así se simplifica el procedimiento de la PCR, eliminando la necesidad de añadir una enzima en cada ciclo. Sin embargo, parece que la Taq polimerasa extiende un cebador/molde desajustado en comparación con otras polimerasas con actividades exonucleasa a prueba de lectura, por ejemplo ADN polimerasas Klenow y T7, que no son termoestables.

35 Otra técnica muy eficaz que emplea la extensión del cebador es la técnica de secuenciación en ciclo usada para determinar el orden de ácidos nucleicos en una secuencia nucleotídica diana. Este procedimiento implica ciclos repetidos de extensión del cebador mientras se secuencia la secuencia nucleotídica diana.

40 Consideraciones similares, tal como se mencionan más arriba para el método de PCR, se aplican para el procedimiento de secuenciación en ciclo. También, en las reacciones de secuenciación, la desnaturalización completa del ADN molde es de crucial importancia para que la reacción tenga éxito. Así, las regiones de ADN con motivos repetidos, alto contenido en GC y estructuras secundarias rígidas son difíciles de secuenciar. Además, es problemática la secuenciación de un tramo de nucleótidos muy largo, o una secuencia nucleotídica diana presente en una cantidad minúscula. La capacidad para llevar a cabo una desnaturalización completa del ADN de doble hebra y de realizar las reacciones de secuenciación a temperaturas reducidas, tanto con la polimerasa Taq como con la polimerasa no termoestable, es ventajosa en términos tanto de rendimiento como de precisión.

45 En un intento por mejorar el rendimiento y la especificidad de la PCR y las reacciones de secuenciación, se empleó un número de tampones adicionales. Se mostró que ciertos codisolventes, tales como DMSO (Pomp y Medrano, 1991; Filichkin y Gelvin, 1992), glicerol (Cheng *et al.*, 1994; Patentes de EE.UU. 5.432.065 y 5.545.539), formamida (Corney *et al.*, 1991) y betaína (Patentes alemanas DE 4411594 C1 y DE 4411588 C1; Mytelka *et al.*, 1991) facilitan la PCR clásica y/o la secuenciación en ciclo. Se ha sugerido que el DMSO puede afectar a las temperaturas de fusión (T_f) del ADN molde y de los cebadores nucleotídicos y/o al grado de separación de la hebra del producto a una particular "desnaturalización", así como mejorar la actividad térmica de la ADN polimerasa Taq (Gelfand y White, 1989). El glicerol puede influir en las largas amplificaciones (i) duplicando la estabilidad térmica de la polimerasa Taq a 95-97°C, y (ii) disminuyendo eficazmente las temperaturas de fusión del ADN (en 2,5-3°C por cada 10% de aumento en la concentración de glicerol) (Cheng *et al.*, 1994). Todavía, el uso de estos aditivos tampón está limitado, por ejemplo las soluciones que contienen glicerol en concentraciones eficaces de 20-40% son viscosas y difíciles

ES 2 323 561 T3

de manejar (Patente de EE.UU. 5.432.065), el DMSO en una concentración del 10% inhibe la actividad de la ADN polimerasa Taq en un 53% y la ADN polimerasa T7 se inactiva completamente en formamida al 40%.

5 Los compuestos 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)], también conocido como ectoína, y su hidroxiderivado, 2-metil-4-carboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(A)] fueron previamente identificados en el laboratorio de los inventores de la presente invención como metabolitos en varios microorganismos de *Streptomyces* (invar. y Lapidot, 1988a; 1988b y 1991; Malin y Lapidot, 1996). La ectoína también se encontró en una variedad de bacterias halofílicas y halotolerantes (Galinski *et al.*, 1985). THP(B) y THP(A) son compuestos zwitterónicos (Invar. *et al.*, 1993; Fig. 1) con muchas propiedades útiles, tales como osmoprotección y dermoprotección de varios organismos de la especie *Streptomyces* y células de *E. coli* (Malin y Lapidot, 1996). THP(B) y THP(A) no son tóxicos ni para las células de mamífero ni para los animales (Lapidot *et al.*, 1995). La Patente de Israel No. 100810 y su correspondiente Patente de EE.UU. No. 5.789.414 y Patente Europea No. EP 0553884 de los presentes solicitantes describe que THP(A) y THP(B) interactúan con el ADN y protegen al ADN, en tejidos no tumorales, del daño por fármacos y así, pueden usarse para disminuir los efectos tóxicos de fármacos que se unen al ADN, tales como adiamicina y actinomicina D.

15 La prolina es otro agente osmoprotector que se acumula en plantas, bacterias, algas e invertebrados marinos como respuesta a estrés por salinidad. Se mostró que la prolina desestabiliza el ADN y contrarresta parcialmente el efecto del cloruro sódico y la espermidina sobre la estabilidad de la doble hélice, y disminuye la temperatura de fusión del ADN de una manera dependiente de la concentración (Rajendrakumar *et al.*, 1997).

20 El documento WO 95/20682 se refiere a la mejora de la secuenciación del ADN y a los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa por adición de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como betaína, N-óxido de trimetilamina y dimetilglicina para disminuir la incidencia de las paradas o pausas de la ADN polimerasa.

25 Ninguna de las referencias de arriba describen o sugieren el uso de prolina, THP(A) o THP(B) o mezclas de los mismos como aditivos en las mezclas de reacción de PCR y en reacciones para la secuenciación de nucleótidos.

30 Ahora se ha encontrado, según la presente invención, que THP(B) es eficaz en la disminución de la temperatura de fusión del ADN de doble hebra, y que la prolina, THP(B) y THP(A) son capaces de aumentar la estabilidad térmica de las ADN polimerasas a temperaturas elevadas, indicando que pueden ser útiles en procedimientos que implican la fusión del ADN de doble hebra y/o síntesis del ADN mediada por la polimerasa, tal como en la extensión del cebador, en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y en la secuenciación del ADN.

35 Así, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar una reacción de extensión cíclica del cebador que comprende las etapas de:

(i) hacer contactar un ADN molde que comprende una secuencia nucleotídica diana con al menos un cebador oligonucleotídico complementario a una secuencia nucleotídica en el extremo 3' de dicha secuencia diana, bajo condiciones que permiten el apareamiento de dicho cebador con su secuencia nucleotídica complementaria sobre dicha secuencia diana, en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)] y mezclas de los mismos, para disminuir la temperatura de fusión de dicho ADN molde y/o dicho cebador.

45 (ii) llevar a cabo una extensión mediada por polimerasa de dicho cebador sobre dicha secuencia nucleotídica diana en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), 2-metil-4-carboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(A)] y mezclas de los mismos, para estabilizar dicha polimerasa; y

50 (iii) repetir las etapas (i) y (ii) una pluralidad de veces, donde la etapa (i) está precedida por desnaturalización térmica del ADN a una temperatura adecuada para separar tanto dicho ADN molde en su hebras como el cebador, extendido por la polimerasa, de la etapa (ii) de su secuencia de nucleótidos diana complementaria, dicha temperatura siendo una temperatura en la que la polimerasa usada en la etapa (ii) es estable;

55 donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M; y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M; y donde en presencia de prolina a solas se utiliza una polimerasa no termoestable para realizar la reacción de extensión ciclada del cebador y la prolina permite las temperaturas de funcionamiento a las cuales la polimerasa no termoestable podría, por el contrario, ser sensible a inactivación térmica,

60 obteniendo así una extensión específica del cebador de alto rendimiento sobre dicha secuencia de nucleótidos diana del ADN molde.

Las etapas (i) y (ii) se repiten en la etapa (iii) una pluralidad de veces, por ejemplo 10-90 veces, preferiblemente 15-35 veces.

65 En una realización, la invención se refiere a un método para determinar una secuencia nucleotídica de un ADN diana, donde en la etapa (i) la secuencia diana del ADN molde es una secuencia de nucleótidos a ser secuenciada, y la extensión del cebador mediada por polimerasa en la etapa (ii) se lleva a cabo en presencia de los cuatro dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y en presencia de una cantidad minúscula de ddATP, o ddCTP, o ddGTP o ddTTP, antes de la

ES 2 323 561 T3

determinación de la secuencia nucleotídica del ADN diana. El dGTP puede ser sustituido por 7-deaza-dGTP descrito en EP 0212536.

5 Según esta realización, el método para determinar una secuencia nucleotídica de un ADN diana comprende las etapas de:

10 (i) calentar un ADN molde que comprende una secuencia de nucleótidos diana a ser secuenciada a una temperatura adecuada para separar dicho ADN molde en sus hebras en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)] y mezclas de los mismos;

15 (ii) poner en contacto dicho ADN molde desnaturalizado de la etapa (i) con un cebador oligonucleotídico complementario a la secuencia nucleotídica en el extremo 3' de dicha secuencia de nucleótidos diana bajo condiciones que permiten el apareamiento de dicho cebador con su secuencia nucleotídica complementaria sobre la secuencia diana, en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)] y mezclas de los mismos;

20 (iii) llevar a cabo una extensión, mediada por polimerasa, de dicho cebador de la etapa (ii) en presencia de los cuatro dNTPs naturales: dATP, dCTP, dGTP (o 7-deaza-dGTP) y dTTP, de una cantidad minúscula de ddATP, o ddCTP, o ddGTP o ddTTP y de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(A)] y mezclas de los mismos;

(iv) repetir las etapas (i)-(iii) una pluralidad de veces; y

25 (v) determinar la secuencia nucleotídica del ADN diana.

En otra realización, la invención proporciona un método para amplificar una secuencia de nucleótidos diana por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde en la etapa (i) la secuencia diana del ADN molde es una secuencia de nucleótidos que hay que amplificar y el ADN molde se pone en contacto con dos cebadores oligonucleotídicos complementarios con las secuencias nucleotídicas en los extremos 3' de dicha secuencia de nucleótidos diana y su hebra opuesta; en la etapa (ii) se lleva a cabo una extensión, mediada por polimerasa, de los cebadores apareados de la etapa (i); las etapas (i)-(ii) se repiten una pluralidad de veces, la última etapa siendo la etapa (ii), generando así múltiples copias de la secuencia de nucleótidos diana.

35 Según esta realización, la invención se refiere a un método para amplificar una secuencia de nucleótidos diana por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende las etapas de:

40 (i) calentar un ADN molde que comprende una secuencia de nucleótidos diana para ser amplificada a una temperatura adecuada para separar dicho ADN molde en sus hebras en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)] y mezclas de los mismos;

45 (ii) poner en contacto el ADN molde de la etapa (i) con dos cebadores oligonucleotídicos complementarios con las secuencias nucleotídicas en los extremos 3' de dicha secuencia de nucleótidos diana y su hebra opuesta, en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)] y mezclas de los mismos, bajo condiciones que permiten el apareamiento de dichos cebadores oligonucleotídicos con sus secuencias complementarias sobre dicha secuencia de nucleótidos diana y su hebra opuesta;

50 (iii) llevar a cabo una extensión, mediada por polimerasa, de los cebadores apareados de la etapa (ii) en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), 2-metil-4-carboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(A)] y mezclas de los mismos; y

(iv) repetir las etapas (i)-(iii) una pluralidad de veces, siendo la última etapa la etapa (iii),

generando así múltiples copias de la secuencia de nucleótidos diana.

55 Los métodos de la invención son particularmente útiles para reacciones que implican ADNs ricos en GC, disminuyendo o eliminando así las dificultades encontradas en la amplificación y secuenciación de moléculas de ADN ricas en GC. Los métodos son también útiles para reacciones que implican las etapas (ii) o (iii) una ADN polimerasa termoestable, tal como polimerasa Taq, polimerasa KlenTaq1 y polimerasa Pfu, o una ADN polimerasa no termoestable tal como ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T4, Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, transcriptasas inversas, polimerasa Bca, polimerasa Bst y mutantes de estas polimerasas.

60 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), THP(A) y mezclas de los mismos como un aditivo en una reacción para determinar una secuencia nucleotídica o como un aditivo en una mezcla de reacción de PCR, donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M, y a kits que comprenden en recipientes separados: (a) los reactivos necesarios para la secuenciación del ADN o los reactivos necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa, y (b) prolina, THP(A) o THP(B).

ES 2 323 561 T3

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para disminuir la temperatura de fusión del ADN de doble hebra (ADNdh) que comprende añadir a la mezcla de incubación de dicho ADNdc 0,5-4 M de THP(B).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para aumentar la estabilidad de una ADN polimerasa a elevadas temperaturas que comprende añadir a la mezcla de incubación de dicha polimerasa una cantidad eficaz de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), THP(A) y mezclas de los mismos, donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M.

La Fig. 1 representa las fórmulas estructurales de THP(A) (izquierda) y THP(B) (derecha).

La Fig. 2 representa la transición térmica del ADN de timo de ternera en ausencia y presencia de las cantidades indicadas de THP(B): 0,8 M, 2 M, 3 M y 4 M. La fusión del ADN se llevó a cabo tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (ii).

La Fig. 3 representa la variación de la temperatura de fusión (Tf) con la concentración de THP(B) para los ADNs de composiciones base variables. La fusión del ADN se llevó a cabo y las Tf se determinaron tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (ii). (triángulos rellenos)-ADN de timo de ternera; (círculos rellenos)-ADN de *micrococcus lysodeikticus*; (cuadrados rellenos)-ADN de *Chlostridium perfringens*; (triángulos vacíos)-poli(dA-dT).

Las Figs. 4A-B representa las transiciones térmicas de los oligonucleótidos [d(ATGCAT)]₂ y [d(GCTTAAGC)]₂, respectivamente. Los cambios químicos del protón C4H5 de [d(ATGCAT)]₂ y del protón G1H8 de [d(GCTTAAGC)]₂ se midieron tal como se describen en Materiales y Métodos, sección (iii), como una función de temperaturas crecientes en ausencia (cuadrados vacíos) o presencia de 0,5 M (círculos vacíos) y 1 M (cuadrados rellenos) de THP(B).

La Fig. 5 representa el curso temporal de la inactivación térmica de la ADN polimerasa Taq a 97°C en ausencia (círculos rellenos) y presencia tanto de 1 M de THP(B) (cuadrados rellenos), como de 1 M de THP(A) (cuadrados vacíos) o de 1 M de glicerol (rombos vacíos). La inactivación térmica se determinó a diferentes periodos de tiempo a partir de la actividad remanente de la polimerasa Taq medida tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (vi).

La Fig. 6 representa la tinción con bromuro de etidio de los productos de ADN amplificados por PCR en un gel de agarosa al 1,7%. La PCR se llevó a cabo según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, sección (viii), para la amplificación de un fragmento de 349 pares de bases (66,5% de contenido en GC) a partir de un ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui* a dos temperaturas de desnaturalización (Tf) diferentes, 95°C (izquierda) y 92°C (derecha), en ausencia y en presencia de 0,5 M de THP(B), tal como se indica. Se muestran dos o tres repeticiones de cada experimento.

Las Figs. 7A-C representan la tinción con bromuro de etidio de los productos de ADN amplificados en un gel de agarosa al 1,7%. La PCR se llevó a cabo según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, sección (viii), para la amplificación de un fragmento de 349 pares de bases (66,5% de contenido en GC) a partir de un ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui* a tres temperaturas de desnaturalización (Tf) diferentes: 95°C (Fig. 7A), 90°C (Fig. 7B) y 89°C (Fig. 7C), en ausencia y presencia de 1 M de THP(B). Se muestran dos o tres repeticiones de cada experimento.

Las Figs. 8A-8B representan la transición térmica del ADN de timo de ternera (Fig. 8A) y otros ADNs (Fig. 8B) en presencia y ausencia de prolina. La fusión del ADN se llevó a cabo tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (ii). La Fig. 8A-(rombos rellenos)-sin adición de prolina; (cuadrados vacíos)-2,0 M; (triángulos rellenos)-3,5 M; (cuadrados rellenos)-5,0 M; (triángulos vacíos)-5,5 M; (círculos rellenos)-6,2 M de prolina. La Fig. 8B, en presencia de 6,2 M de prolina: (triángulos vacíos)-ADN de *Micrococcus lysodeikticus*; (triángulos rellenos)-ADN de *Clostridium perfringens*; (cuadrados rellenos)-ADN de timo de ternera; (círculos rellenos)-poli(dA-dT).

La Fig. 9A representa una variación de Tf con la concentración de prolina para ADNs de composiciones base variables. La fusión del ADN se llevó a cabo tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (ii). (cuadrados rellenos)-ADN de timo de ternera; (triángulos vacíos)-ADN de *Micrococcus lysodeikticus*; (triángulos rellenos)-ADN de *Clostridium perfringens*; (círculos rellenos)-poli(dA-dT).

La Fig. 9B representa los cambios en dTf/dGC como una función de la concentración de prolina.

La Fig. 10 representa la actividad de la ADN polimerasa Klenow a 37°C en ausencia (barras negras) y en presencia de 5,0 M de prolina (barras ralladas). La actividad de la ADN polimerasa Klenow se midió a 6,7; 10 y 15 mM de MgCl₂ tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (iv).

La Fig. 11 representa el curso temporal de la inactivación térmica de la ADN polimerasa Klenow a 65°C en ausencia (círculos rellenos) y presencia tanto de 5 M de prolina (rombos vacíos) como de 5 M de glicerol (triángulos rellenos). La actividad remanente de la ADN polimerasa Klenow se midió a diferentes periodos de tiempo tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (vii).

ES 2 323 561 T3

La Fig. 12 representa La tinción con bromuro de etidio de los productos de ADN amplificados por PCR en un gel de agarosa al 2,0%. La PCR se llevó a cabo según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, sección (ix), para la amplificación de un fragmento de 349 pares de bases (66,5% GC) a partir de ADN genómico de *Halobacterium marismortui*, usando 10 y 15 unidades de fragmento Klenow de la ADN polimerasa I.

La Fig. 13 representa la tinción con bromuro de etidio de los productos de ADN amplificados por PCR en un gel de agarosa al 1,7%. La PCR se llevó a cabo según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, sección (x), para la amplificación de un fragmento de 349 pares de bases (66,5% GC) a partir del ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui* catalizado por la ADN polimerasa Taq a dos temperaturas de desnaturalización (Td) diferentes, a 95°C y 91°C, en ausencia y en presencia de 1,0 M de prolina. Se muestran tres repeticiones de cada experimento.

La Fig. 14 representa la tinción con bromuro de etidio de los productos de ADN amplificados por PCR en un gel de agarosa al 1,7%. La PCR se llevó a cabo según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, sección (xi), para la amplificación de un fragmento de 349 pares de bases (66,5% GC) a partir del ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui* catalizado por la ADN polimerasa KlenTaq1 a dos temperaturas de desnaturalización (Td) diferentes, a 77°C y 75°C, en presencia de 4,0 M de prolina. Se muestran dos repeticiones de cada experimento.

El término “extensión del cebador” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un proceso para aumentar la longitud de un oligonucleótido complementario a una secuencia nucleotídica comprendida dentro de un ADN molde. El proceso consiste en añadir de forma repetida al extremo 3' del oligonucleótido un solo nucleótido que está dictado por el nucleótido presente en la posición correspondiente en la hebra complementaria del ADN molde. El término “extensión ciclada del cebador” se refiere a un procedimiento que implica ciclos repetidos en los que la extensión del cebador se alterna con calentamiento periódico, a través del cual se da la separación del cebador extendido a partir de la hebra del ADN molde.

El término “temperatura de fusión (Tf)” del ADN de doble hebra (ADNdh) se refiere a una temperatura a la cual el 50% de la muestra de ADN es separada en sus dos hebras de ADN complementarias.

El término “amplificar” se refiere a la copia repetida de una secuencia de nucleótidos específica que da como resultado un aumento de la cantidad de dicha secuencia de nucleótidos específica.

El término “secuenciar” se refiere a un procedimiento para determinar el orden en el que se encuentran los nucleótidos en una secuencia de nucleótidos diana.

El término “secuencia de nucleótidos diana” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se pretende duplicar, amplificar o secuenciar.

El término “ADN molde” se refiere a moléculas de ADN o fragmentos de las mismas de cualquier fuente o composición nucleotídica, que comprende una secuencia nucleotídica diana tal como se define más arriba.

Según la presente invención, THP(B) o la prolina o las mezclas de los mismos pueden disminuir de forma significativa la temperatura de fusión del ADNdc, y la prolina, THP(B) o THP(A), solos o en combinación, aumentar la estabilidad de las ADN polimerasas incubadas a temperaturas elevadas.

THP(B) y THP(A) para uso en la invención pueden ser aislados de fuentes naturales tal como, por ejemplo, a partir de microorganismos productores de actinomicina D de la especie *Streptomyces*, por ejemplo *S. Parvulus*, *S. chrismomalus*, o *S. antibioticus*, y separados en forma purificada tal como se describe en la patente IL N°. 100810 y sus correspondientes US 5,789,414 y EP 0553884. THP(B) solo, puede ser aislado y purificado a partir de bacterias halofílicas y halotolerantes tales como las bacterias del género *Ectothiohodospira*, por ejemplo *E. halochloris*, *E. halophila* y mutantes de las mismas o a partir de eubacterias halofílicas heterotrópicas de la familia *Halomonadaceae* crecidas en condiciones de alta salinidad. THP(A) solo, puede ser aislado y purificado a partir de microorganismos de la tierra de la especie *Streptomyces*, por ejemplo *S. clavuligerus*, *S. griseus* y mutantes de las mismas, con bajo estrés salino tal como 0,25-0,5 N de NaCl. THP(B) también se puede producir de forma sintética tal como describe la Solicitud de Patente Japonesa N°. 63-259827.

L-prolina es un aminoácido común que está disponible comercialmente o puede ser producido de forma sintética y obtenido en forma altamente purificada.

Según la invención, se encontró que THP(B) disminuye la Tf de oligonucleótidos tan cortos como 6-8 unidades monoméricas y de ADNs de doble hebra que son tanto ADNs genómicos, como cADNs o como moléculas de ADN recombinante, de una forma dependiente de concentración, en concentraciones que están en el intervalo de 0,5 a 4 M. La temperatura de fusión de oligonucleótidos cortos (6 u 8 unidades monoméricas) se redujo de 3 a 6°C en presencia de 0,5 y 1,0 M de THP(B).

La magnitud de la disminución de la Tf depende del contenido de GC del oligonucleótido en particular o del ADNdc, siendo más pronunciada en ADNs con alto contenido en GC. Por ejemplo, la disminución de la Tf del ADN de timo de ternera (42% en GC) y del ADN de *Micrococcus lysodeiktius* (72% en GC) en presencia de THP(B) fue significativamente mayor que la del ADN de *Clostridium perfringens* (26% en GC), mientras que no se pudo observar

cambio en la Tf del oligonucleótido sintético poli(dA-dT) en presencia de THP(B) a concentraciones tan altas como 4 M. A la concentración de THP(B) de 4 M los ADNs con distinto contenido en GC se funden en un intervalo de temperatura muy estrecho (40-43°C), mientras que en ausencia de THP(B), la temperatura de fusión está en el intervalo de 39 a 75°C. La isoestabilización de la molécula de ADN por THP(B) puede explicarse como resultado de una desestabilización mayor de ADNs ricos en GC en lugar de ADNs ricos en AT. THP(B) elimina la dependencia de composición de pares de bases del ADN en la fusión del ADN.

Según la invención, se encontró que la prolina, conocida por disminuir la tempera de fusión del ADN (Rajendrakumar *et al.*, 1997), sólo disminuye ligeramente la actividad enzimática de la polimerasa Klenow y que es un mejor estabilizador de la polimerasa Klenow que el glicerol, con una semi-vida de la enzima de 21 minutos a 65°C en 5 M de L-prolina. Estos hallazgos han permitido un diseño de éxito de un protocolo de PCR para un mejor ADN genómico molde rico en GC. La cantidad de polimerasa Klenow en el protocolo aquí presentado (10-15 unidades) puede además reducirse cuando se usa 7-deaza-dGTP en lugar de dGTP, debido a la disminución esperada de la temperatura de desnaturalización. Los resultados aquí presentados revelan que la concentración de prolina en el intervalo de 3-5,5 M es suficiente para conferir estabilidad a la polimerasa Klenow.

La prolina puede ser usada como aditivo único en el protocolo o en combinación con glicerol o cualquier otro agente desestabilizante de ADN que tolere la polimerasa, tal como THP(B) o THP(A). La prolina (hasta 5,0 M) disminuye la temperatura de fusión (Tf) de varios ADNs y da lugar a "isoestabilización" parcial del ADN (una disminución de la diferencia de Tf entre los pares GC y AT, manifestada por una disminución lineal aparente del factor dTf/dGC (Melchior *et al.*, 1973; Rees *et al.*, 1993), mientras que a concentraciones más altas, la prolina desestabiliza los pares GC y AT uniformemente. No se alcanzó una "isoestabilización" completa del ADN para la prolina, como en el caso de betano (Rees *et al.*, 1993) THP(B) (igual estabilidad de pares AT y GC, dTf/dGC = 0). Los valores de Tf de los ADNs naturales ensayados (57-78°C) disminuyeron a un intervalo estrecho de 28-32°C en presencia de 6,2 M de prolina. La "isoestabilización" parcial del ADN por la prolina a alta concentración puede causar baja especificidad de la PCR, cuando se usan cebadores de 20-25 pares de bases.

Se encontró que los cebadores de 30-35 pares de bases de longitud, usados en el protocolo de PCR aquí presentado, son eficaces para remediar la disminuida especificidad cebadora a altas concentraciones de prolina, y para lograr una buena selectividad de amplificación.

Además de la PCR clásica y la secuenciación del ADN, el protocolo con prolina puede ser interesante para los siguientes métodos: a) uso de la polimerasa Klenow en combinación con cebadores hexaméricos contiguos y proteína de unión a ADN de cadena sencilla para una formación específica del cebador (Kieleczawa *et al.*, 1992) utilizando cantidad bastante baja de una fuente de ADN; b) el ciclo de baja temperatura de desnaturalización podría permitir el uso de menos etiquetas termoestables para la secuenciación o PCR del ADN. Este enfoque podría ser útil para otras polimerasas termoestables en PCR y en otros métodos de amplificación del ADN. Por ejemplo, la ADN polimerasa T7 y sus modificaciones, capaces de amplificar ADN rico en GC y regiones con estructuras secundarias estables, podrían proporcionar soluciones a los casos que aún permanecen mas allá de la práctica de PCR actual y las capacidades de secuenciación del ADN, tal como la amplificación de largas secuencias repetidas de tripletes CGG. La introducción de la polimerasa T4 a la PCR ciclada podría ser de interés para los casos que requieren alta fidelidad, por ejemplo para amplificación de secuencias presentes a muy baja frecuencia que requieren muchos ciclos de amplificación para ser detectadas.

Según la invención además se encontró que la prolina, THP(B) y THP(A), solos o en combinación, pueden estabilizar tanto las ADN polimerasas termoestables como las no termoestables incubadas a altas temperaturas, el efecto estabilizante es más pronunciado cuando la enzima es incubada durante periodos de tiempo prolongados a una temperatura superior que la temperatura de sus actividades óptimas. La polimerasa Taq termoestable, tras 30-35 minutos de incubación a temperatura típica de desnaturalización del ADN a 95°C, sólo es activa un 50%, y tras 30 minutos de incubación a 97°C, sólo es activa un 10% en comparación al 40% en presencia de 1 M de THP(B) y incluso superior, 55% en presencia de THP(A). Un efecto mucho más dramático se obtiene a tiempo de incubación más largo (60 minutos), donde la actividad remanente es menos del 5% sin aditivos y es 55% en presencia de THP(A) (10 veces superior). Las polimerasas no termoestables son mucho más sensibles a la inactivación térmica, por ejemplo, la semi-vida de la ADN polimerasa Klenow es alrededor de 30-50 segundos a 65°C, mientras que en presencia de 5 M de prolina es de 25 minutos, alrededor de 30-50 veces superior.

En realizaciones preferidas, la extensión ciclada del cebador de cualquier ADN molde se lleva a cabo con la polimerasa termoestable Taq a 60-80°C en presencia de 0,5-3,5 M de THP(B), opcionalmente con 0,5-3,0 M de THP(A), o 1-5 M de prolina, o con una polimerasa no termoestable a 30-65°C en presencia de 1-3 M de THP(B), opcionalmente con 0,5-3,0 M de THP(A), o 1-5 M de prolina.

Es beneficioso disminuir la Tf del ADNdc por la prolina y/o THP(B) y estabilizar las ADN polimerasas por la prolina, THP(B) y/o THP(A) para los procesos de extensión ciclada del cebador que comprenden etapas de fusión del ADN y de síntesis de ADN mediada por polimerasa, tales como secuenciación de ADN y procesos de PCR, que dan lugar a altos rendimientos de desnaturalización de ADNdc, a saber, separación del ADNdc en sus dos hebras complementarias a una temperatura inferior, y alto rendimiento de las ADN polimerasas.

ES 2 323 561 T3

La concentración del agente osmoprotector a usar en una reacción de extensión ciclada del cebador particular depende del ADN molde específico, el/los cebador/es, la ADN polimerasa y las condiciones de reacción empleadas. Bajas concentraciones de THP(B) o prolina, típicamente alrededor de 0,5-1,5 M, son preferidas para disminuir la Tf de un ADN de contenido medio en GC, mientras que son preferidas concentraciones superiores, típicamente 1-3 M para ADN de alto contenido en GC, para además disminuir la Tf y, por tanto, la temperatura de desnaturalización empleada. Para evitar una seria disociación del cebador/ADN molde, cuando se usan altas concentraciones de THP(B) (3-4 M) y prolina (4-5 M) para disminuir la Tf del ADN al intervalo de 40-55°C, se usan cebadores de al menos 30 nucleótidos. Estas modificaciones mejoran el apareamiento y el rendimiento de la reacción.

El uso de ADN polimerasas no termoestables tales como ADN polimerasa T7 o Klenow es de principal importancia en casos donde la precisión de la amplificación del ADN es crucial, tal como en la detección de cambios sutiles en la secuencia del ADN y en procesos de tipado por PCR y diagnóstico de algunas enfermedades genéticas y cáncer causados por mutaciones menores, debido a su alta fidelidad en la replicación del ADN y capacidad de corrección.

Realizar las reacciones de extensión del cebador a temperaturas reducidas también permite el uso de compuestos fluorescentes termosensibles y otros compuestos lábiles para etiquetar las hebras del ADN nuevamente sintetizadas para uso como sondas en la detección de secuencias de nucleótidos diana complementarias por ensayos sensibles tales como la detección de quimioluminiscencia.

Las condiciones de reacción usadas en la PCR son variables dependiendo de la naturaleza del ADN molde y de los cebadores, y el pH óptimo y las concentraciones de sal e iones magnesio son normalmente determinadas de forma empírica para cada reacción en particular. Un procedimiento típico de PCR implica ciclos de temperatura para proporcionar condiciones adecuadas para llevar a cabo tres etapas en cada ciclo de PCR: (i) desnaturalización del ADN; (ii) apareamiento del cebador; y (iii) extensión del cebador.

Una etapa (i) clásica de incubación y desnaturalización a 94-95°C durante 0,5-2 minutos normalmente es suficiente para separar las hebras del ADN de un contenido medio en GC del ADN original y nuevamente sintetizado. La etapa de apareamiento del cebador (ii) normalmente se lleva a cabo a alrededor de 5°C por debajo de la temperatura de fusión del duplex cebador-ADN molde. Sin embargo, si se obtienen productos no específicos de PCR además del producto esperado, la temperatura de apareamiento debe aumentarse. La etapa de extensión (iii) del cebador apareado en su extremo 3' para sintetizar una nueva hebra de ADN, complementaria a la hebra molde, normalmente se lleva a cabo por la enzima termoestable polimerasa Taq a 70-75°C, que es el intervalo de temperatura óptima para la actividad de la enzima (~2-4 Kb/min).

La desnaturalización completa del ADN molde, especialmente en los primeros ciclos de amplificación, es de gran importancia en los procesos de PCR, de lo contrario, su uso como molde para las siguientes etapas de la reacción disminuye y da como resultado un rendimiento pobre del producto de PCR. Esto es especialmente relevante cuando un duplex de ADN amplificado tiene un alto contenido en GC, traduciendo esto en dificultad para separar las hebras, o cuando una secuencia nucleotídica diana está presente en una cantidad minúscula en la mezcla de reacción inicial. Así, los tampones de PCR que contienen solutos que dan Tfs significativamente bajas de los ADNs molde son más importantes en los procesos de PCR. La adición de prolina, THP(B), THP(A) o mezclas de los mismos a los procesos de PCR es beneficiosa a tres niveles: (i) rendimiento aumentado de los productos de PCR amplificados; (ii) sensibilidad aumentada; y (iii) especificidad de la reacción aumentada. El efecto de la prolina y THP(B) para disminuir las Tfs de los cebadores oligonucleotídicos y de los ADNs moldes, y el efecto de la prolina, THP(B) y THP(A) para estabilizar las ADN polimerasas, da como resultado un uso más eficaz de los ADNs molde, los cebadores y las enzimas de la reacción, dando lugar a alto rendimiento del producto de ADN amplificado por PCR. Además, la aumentada sensibilidad de los ensayos de PCR en presencia del aditivo permite la detección de secuencias de ADN dianas que no son detectables en su ausencia. Esto es especialmente significativo en casos donde tienen que amplificarse secuencias diana muy raras o largas. Además, los aditivos también mejoran la calidad de la amplificación por PCR reduciendo o eliminando de forma significativa productos no específicos. La mejorada precisión de la PCR en presencia de prolina, THP(B) y/o THP(A) permite llevar a cabo protocolos de PCR con elevado número de ciclos y tiempos de ciclo más largos, sin afectar a la calidad de los productos de la reacción.

En otra realización, la invención proporciona un método secuenciación en ciclo del ADN, que comprende poner en contacto un ADN molde con un cebador homólogo a una secuencia específica sobre un ADN diana en presencia de una ADN polimerasa y una cantidad eficaz de prolina, THP(B) y/o THP(A) bajo condiciones que permiten la secuenciación del ADN.

Un protocolo común de secuenciación en ciclo del ADN conocido como método Sanger o método de secuenciación didesoxi, típicamente incluye aislar un ADN molde de doble hebra, separarlo en sus hebras sencillas, añadir un cebador de secuenciación homólogo a una secuencia de nucleótidos sobre el ADN diana y realizar una extensión ciclada del cebador de dicho cebador sobre el ADN diana. La extensión ciclada del cebador es realizada en cuatro reacciones paralelas, cada una de las cuales incluye una pequeña cantidad de un didesoxinucleótido trifosfato, o ddATP, o ddCTP, o ddGTP o ddTTP, junto con un exceso molar de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) necesarios normalmente para la síntesis del ADN, es decir dATP, dCTP, dGTP o dTTP. El crecimiento de la cadena extendida de ADN se para cuando una molécula de ddNTP se incorpora a ella, generando así una serie de productos de extensión de varias longitudes. Cuando estos productos de extensión de las cuatro reacciones de extensión son separados lado a lado, por ejemplo sobre un gel de poliacrilamida, se obtiene un patrón. Usando un cebador marcado o un ddNTP

ES 2 323 561 T3

marcado, típicamente radiactivo o fluorescente, este patrón puede ser monitorizado, por ejemplo, por autorradiografía, detección de fluorescencia, etc. y se puede determinar la secuencia del ADN.

5 La secuenciación en ciclo del ADN también implica extensión en ciclo del cebador, así, el resultado de la secuenciación está influenciado por criterios similares tal como se mencionó más arriba para la PCR. El grado de desnaturalización del ADN molde y del cebador, así como la actuación de la polimerasa, son de crucial importancia para la sensibilidad y precisión de una reacción de secuenciación. Las condiciones de reacción exactas para realizar un método de secuenciación en ciclo del ADN y las concentraciones eficaces del agente osmoprotector añadido varían dependiendo del ADN molde, los cebadores, el ADN diana a ser secuenciado y la ADN polimerasa usada en una
10 reacción particular.

La secuenciación en ciclo realizada de acuerdo con la invención en presencia de prolina, THP(B) y/o THP(A), es una herramienta beneficiosa y sensible. El aditivo agente osmoprotector permite obtener una secuencia de una larga extensión de nucleótidos en una única reacción, así como secuenciar cantidades diminutas del ADN presente, por
15 ejemplo, en muestras limitadas de sangre o tejido usadas en patología forense y en biología de la evolución. Además, algunas ADNs ricos en GC u otros ADNs con estructura secundaria compleja o rígida que son muy difíciles de secuenciar usando mezclas de reacción convencionales pueden, así, ser secuenciadas con éxito. Ya que en presencia de los aditivos la especificidad del apareamiento del cebador aumenta y se eliminan la mayoría de los productos extendidos no específicos, se hace posible la detección de mutaciones raras. Esto es especialmente importante en el
20 diagnóstico de enfermedades caracterizadas por una pequeña mutación en una secuencia nucleotídica de un gen o en la identificación de altas repeticiones CGG que son indicativos de muchos trastornos en seres humanos, tales como la enfermedad de Huntington (Han *et al.*, 1994).

Los kits para realizar la amplificación del ADN por PCR o para secuenciar en ciclo el ADN de la invención incluyen, respectivamente, los reactivos necesarios para la PCR o la secuenciación del ADN (por ejemplo tampones apropiados, dNTPs, o polimerasa Taq o polimerasa no termoestable, etc.) y, en recipientes separados, THP(B) opcionalmente con THP(A) o prolina.

30 Materiales y métodos

(i) *Materiales*

Para los Ejemplos 1-4, THP(A) y THP(B) se prepararon según Malin y Lapidot (1996) y sus soluciones acuosas se pasaron a través de una columna chelex para separar los cationes divalentes antes de su uso. La betaína (Sigma) se
35 disolvió en agua y se pasó a través de una columna chelex antes de su uso. La ADN polimerasa Taq (recombinante) y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (10 unidades/ μ l) se adquirieron de MBI Fermentas, el ADN de timo de ternera (usado en los ejemplos de fusión del ADN) y el ADN activado de timo de ternera (usado en los ensayos de actividad de la polimerasa), el ADN de *Micrococcus lisodeiktius*, el ADN de *Clostridium perfringens* y poli(dA-dT) de Sigma. Los oligonucleótidos [d(ATGCAT)]₂ y [d(GCTTAAGC)]₂ y los siguientes cebadores 1 y 2 con 28 unidades
40 monoméricas fueron preparados por síntesis de fosfouramidato en fase sólida:

1. 5'>CGG GAT CCA TGG AAT ACG TAT ACG CTG C<3'

2. 5'>CGG AAT TCT TAG CCG AAG AGT TCG CCG A<3'

45 Para los Ejemplos 5-9, la L-prolina 99+% y 99,5+% se adquirió de Sigma y de Fluka, respectivamente, y el glicerol fue de BDH. El ADN activado de timo de ternera y el ADN de timo de ternera eran de Sigma. La ADN polimerasa Taq (recombinante) y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (10 unidades/ μ l) se adquirieron de MBI Fermentas. La ADN polimerasa Klenoq1 de AB Peptides y la ADN polimerasa Pfu (clonada) de Stratagene. El ADN genómico
50 molde de *Halobacterium morismortui* fue un generoso regalo del Dr. Shulamith Weinstein (Kimmelman Laboratory of Biocrystallization, Weizmann Institute of Science).

Se usaron dos pares de cebadores en los Ejemplos 7-9: dos cebadores 3 y 4 de 28 unidades monoméricas con 22 de los nucleótidos complementarios cada uno y con un sitio de restricción terminal; el cebador 3 contiene un sitio
55 de restricción BamHI y el cebador 4 contiene un sitio de restricción EcoRI, y dos cebadores 5 y 6 con 30 unidades monoméricas con todos los 30 nucleótidos complementarios:

3. 5'>CGG GAT CCA TGG AAT ACG TAT ACG CTG C<3'

60 4. 5'>CGG AAT TCT TAG CCG AAG AGT TCG CCG A>3'

5. 5'>ATG GAA TAC GTA TAC GCT GCA CTC ATC CTG<3'

65 6. 5'>TTA GCC GAA GAG TTC GCC GAG GCC CTC ACC<3'.

Todos los oligonucleótidos y cebadores de los Ejemplos 1-9 fueron preparados por la Unidad del Servicio Químico del Weizmann Institute of Science, Rehoboth, Israel, y sus concentraciones en solución se determinaron por absorbancia en UV a 260 nm.

ES 2 323 561 T3

(ii) Experimentos de fusión del ADN

Los estudios de fusión del ADN se llevaron a cabo en un tampón (1 ml) que contiene 5,0 mM de K_2HPO_4 y 0,1 mM de Na_2EDTA a pH 7,5. El tampón y THP(B) o las soluciones de prolina se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,22 μm de Millipore, antes de la adición del ADN, y luego, se gasificaron con helio a temperatura ambiente. Las muestras de ADN se ajustaron a $D.O_{260}=0,2$ y se incubaron durante toda la noche a 37°C antes de su uso, tal como se describió previamente (Rees *et al.*, 1993). Los ADNs en el tampón de más arriba con y sin THP(B) o prolina se midieron en células de cuarzo de 1 cm de recorrido tapadas con Teflón y se incubaron a la temperatura inicial del ensayo durante 5 minutos. El aumento en la absorbancia a 260 nm se monitorizó en un espectrómetro de matriz de diodo de Hewlett Packard 9450A unido a un programador y controlador de temperatura. Tanto la muestra como las células de referencia se calentaron juntas a un ritmo de 0,5°C/minuto y la absorbancia neta se documentó tras cada aumento de 0,5°C. Las Tfs se determinaron gráficamente a partir de los puntos medios de la absorbancia frente al perfil de temperatura.

15 (iii) Medidas de RMN de los cambios químicos

Las medidas de 1H RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AMX 400 NMR MHz a 400,13 MHz (equipado con un control Aspect 300). Para las medidas de 1H RMN, se disolvieron 1,0 mM de nucleótidos de ADN en 0,5 ml de solución de tampón fosfato (pH 7,2) en C_2O (20 mM, para $[d(ATGCAT)]_2$ y 40 mM para $[d(GCTTAAGC)]_2$) que contienen 50 mM de NaCl y 1,0 mM de EDTA. Las soluciones se liofilizaron y luego se redisolviéron en 0,5 mM de C_2O (99,96%), se calentaron a 65°C y se enfriaron gradualmente a 5°C, y luego se gasificaron con argón a temperatura ambiente.

25 (iv) Ensayo de la actividad de la ADN polimerasa Klenow

El ensayo se realizó a 37°C en 15 μl de mezcla de reacción que contiene 67 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 1,0 mM de β -mercaptoetanol, 5,2 nM de $[\alpha\text{-}^{32}P]dATP$, 6,4 μM de dATP y 320 μM de cada dCTP, dGTP, dTTP, 0,6 mM de ADN activado de timo de ternera, y 6,7 mM de $MgCl_2$ para THP o 6,7, 10,0 y 15 mM de $MgCl_2$ para prolina. El fragmento Klenow (0,1 unidades) se añadió a los microtubos con mezcla de reacción precalentada a 37°C, y tras 7,5 minutos de incubación a 37°C (un punto de tiempo dentro de la región de la cinética lineal determinada en un experimento separado, no mostrado), los microtubos de reacción se colocaron en hielo, y la reacción se paró por adición de 12 μl de EDTA 50 mM y luego se aplicó sobre tiras de papel cromatográfico (Whatman N°. 3). Las tiras se lavaron tres veces con TCA frío al 10%, se secaron y se contó la radioactividad.

35 (v) Determinación de actividades remanentes de la polimerasa Taq tras incubación con THP(A) o THP(B) a temperaturas elevadas

La polimerasa Taq (0,5 unidades) se añadió a 50 μl de tampón que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 2,5 ng de ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui*, 2 μM de cada uno de los dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,12 nM de cada uno de los cebadores 1 y 2 con 28 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 50 mM de KCl, Nonidet P40 al 0,08% y 1,0 mM de $MgCl_2$. El THP(B), THP(A) o el glicerol se añadieron de soluciones de reserva 3 M (pH 8,8 a 25°C). Las mezclas de reacción se revistieron con aceite de parafina y se incubaron a 95°C o 97°C. Se tomaron alícuotas (7,5 μl) para el ensayo de actividad polimerasa a diferentes periodos de tiempo.

45 (vi) Determinación de la actividad remanente de la ADN polimerasa Klenow tras incubación a 65°C con prolina

La ADN polimerasa Klenow (0,5 unidades) se incubó a 65°C en 50 μl de tampón que contiene: 67 mM de Tris-HCl (pH 7,4 a 25°C), 2,5 nM de ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui*, 4 μM de cada uno de los dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,12 nM de cada uno de los dos cebadores 3 y 4 con 28 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 6,7 mM de $MgCl_2$ y o sin o en presencia de 5,0 M de glicerol o prolina. El tampón Tris-HCl, el ADN molde, los dNTP, los cebadores y el $MgCl_2$ se añadieron a microtubos de PCR, se evaporaron hasta secarse por vacío rápido y se añadieron los respectivos volúmenes de agua, prolina (de una solución reserva de 5,5 M) o glicerol (de una solución reserva de 5,5 M). Los microtubos se agitaron y se añadió a las muestras la enzima Klenow. Se tomaron alícuotas (5 μl) para el ensayo de actividad de polimerasa a diferentes periodos de tiempo tal como se indica en la Fig. 11. El ensayo de actividad de la ADN polimerasa Klenow se realizó como se describe en la sección (iv) de más arriba a 6,7 mM de concentración de $MgCl_2$. A cada alícuota (5 μl) se añadieron 20 μl de solución reserva que contiene todos los otros componentes del ensayo, dando un volumen total de reacción de 25 μl y una dilución de las alícuotas de 5 veces. Así, la concentración de la prolina y el glicerol en el ensayo de polimerasa fue de 1,0 M, que mostró que estimulaban la actividad de la polimerasa Klenow en un experimento separado (datos no mostrados).

(vii) Procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con THP(B)

La PCR se realizó en 25 μl de mezcla de reacción que contiene 3 ng de ADN molde, 0,12 nM de cada uno de los cebadores 1 y 2 de 28 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 0,5 unidades de ADN polimerasa Taq, 200 μM de cada dNTP, en un tampón de PCR que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 50 mM de KCl, Nonidet P40 al 0,08%. Se usaron concentraciones de $MgCl_2$ de 1,0 mM y 1,75 mM en ausencia y presencia de THP (B), respectivamente, añadidas de la solución reserva 3 M (pH 8,8 a 25°C). Las mezclas de reacción se revistieron con

ES 2 323 561 T3

aceite de parafina y se precalentaron durante 3 minutos a sus respectivas temperaturas de desnaturalización, excepto para las mezclas de reacción realizadas a una Td de 95°C, que se precalentaron durante 3 minutos a 94°C, y luego se sometieron a 35 ciclos térmicos tal como sigue: (i) 30 segundos de incubación a 89-95°C, tal como se indica en cada experimento (etapa de desnaturalización), (ii) 90 segundos de incubación a 55°C (etapa de apareamiento); y (iii) 60 segundos de incubación a 72°C (extensión del cebador).

(viii) PCR en presencia de prolina, usando ADN polimerasa Klenow

La PCR se realizó en una mezcla de reacción de 25 μ l que contiene 100 ng de ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui*, 0,12 nM de cada uno de los cebadores 5 y 6 con 30 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 10 o 15 unidades de ADN polimerasa Klenow, 0,9 mM de cada dNTP, en un tampón de PCR que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4 a 25°C) y 15 mM de Mg(OAc)₂. El tampón Tris-HCl, el ADN molde, los dNTP, los cebadores y el Mg(OAc)₂ se añadieron a microtubos de PCR, se evaporaron hasta secarse con vacío rápido y se disolvieron en 22 μ l de una solución de prolina-glicerol (5,5 M de L-prolina en 12,5% p/v de solución de glicerol en agua). Las mezclas de reacción se precalentaron durante 3 minutos a 75°C, y luego se sometieron a 35 ciclos térmicos como sigue: (i) 20 segundos de incubación a 70°C (etapa de desnaturalización); (ii) 4 minutos de incubación a 37°C (etapas de apareamiento del cebador y extensión del cebador). La ADN polimerasa Klenow (10 o 15 unidades) diluida hasta un volumen de 3 μ l, que contiene 50% p/v de glicerol, se añadió durante el la primera etapa de apareamiento del cebador a 37°C.

(ix) PCR en presencia de prolina, usando ADN polimerasa Taq

La PCR se realizó en 25 μ l de mezcla de reacción que contiene 3 ng de ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui*, 0,12 nM de cada uno de los cebadores 3 y 4 con 28 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 0,5 unidades de ADN polimerasa Taq, 200 μ M de cada dNTP, en un tampón de PCR que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C) y 50 mM de KCl, Nonidet P40 al 0,08%. Las concentraciones de MgCl₂ de 1,0 mM y 1,8 mM se usaron en ausencia y en presencia de 1,0 M de L-prolina, respectivamente. La L-prolina se añadió de la solución reserva 5,5 M ajustada a un pH de 8,8 a 25°C. Las mezclas de reacción se precalentaron durante 3 minutos a sus respectivas temperaturas de desnaturalización, excepto para las reacciones realizadas a Td de 95°C, que se precalentaron durante 3 minutos a 94°C, y luego se sometieron a 35 ciclos térmicos como sigue: (i) 30 segundos de incubación a 91-95°C, como se indicó en cada experimento (etapa de desnaturalización); (ii) 90 segundos de incubación a 55°C (etapa de apareamiento del cebador); y (iii) 60 segundos de incubación a 72°C (extensión del cebador).

(x) PRC en presencia de prolina, usando una mezcla de ADN polimerasas Klentaq1 y Pfu (o Vent)

La PCR se realizó en 25 μ l de mezcla de reacción que contiene 250 ng de ADN genómico molde de *Halobacterium marismortui*, 0,12 nM de cada uno de los cebadores 5 y 6 con 30 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 0,3 μ l de mezcla de enzimas Klentaq1 y Pfu (o Vent), preparada como se describe (Barnes, 1994), 200 μ M de cada dNTP, en un tampón de PCR que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C) y 50 mM de KCl. Las concentraciones de Mg(OAc)₂ de 1,0 mM y 14,5 mM se usaron en ausencia y en presencia de 4,0 M de L-prolina, respectivamente. La L-prolina se añadió de la solución reserva 5,5 M ajustada a un pH de 8,3 a 25°C. Las mezclas de reacción se precalentaron durante 1 minuto a sus respectivas temperaturas de desnaturalización, excepto para las reacciones realizadas a Td de 95°C, que se precalentaron durante 1 minuto a 94°C, y luego se sometieron a 35 ciclos térmicos como sigue: (i) 30 segundos de incubación a 72-95°C, como se indicó en cada experimento (etapa de desnaturalización); (ii) 90 segundos de incubación a 37-55°C, como se indicó en cada experimento (etapa de apareamiento del cebador); y (iii) 7 minutos de incubación a 63-69°C, como se indicó en cada experimento (extensión del cebador).

Ejemplo 1

Fusión del ADN en presencia de THP(B)

Se estudió el efecto de las diferentes concentraciones de THP(B) sobre el perfil de fusión del ADN de timo de ternera (42% de GC). Los experimentos de fusión se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, sección (ii), en ausencia o presencia de 0,8 M, 2 M, 3 M y 4 M de THP(B).

Como se muestra en la Fig. 2, la adición de THP(B) disminuyó de forma significativa la temperatura de fusión del ADN y afiló su perfil de transición. La temperatura de fusión del ADN en solución acuosa, 62°C, se disminuyó a 41°C en presencia de 3 o 4 M de THP(B).

El efecto de THP(B) sobre las temperaturas de fusión del ADN se examinó sobre otros ADNs con diferentes composiciones base, tales como los ADNs de *Micrococcus lysodeiktitus* y *Clostridium perfringens* (72% y 26% de GC, respectivamente) y sobre poli(dA-dT) sintético. Como se muestra en la Fig. 3, las temperaturas de fusión (Tf) de los diferentes ADNs disminuyó con el aumento de la concentración de THP(B) en la mezcla de incubación. Este efecto es más pronunciado para los ADNs ricos en GC. Mientras, el oligonucleótido poli(dA-dT) no exhibe ningún cambio en la temperatura de fusión en presencia de 1-4 M de THP(B), 3-4 M de THP(B) eliminaba la dependencia de

composición de pares de bases de la fusión térmica del ADN. Como se muestra en la Fig. 3, en presencia de 4 M de THP(B), todos los ADNs con un amplio intervalo de contenido en GC se funden en un intervalo de temperatura muy estrecho (40-43°C), mientras que en ausencia de THP(B), las temperaturas de fusión estaban en el intervalo de 30 a 75°C. Este efecto de isoestabilización por THP(B) puede ser explicado como resultado de una mayor desestabilización de los ADNs ricos en GC que de ADNs ricos en AT.

Ejemplo 2

10 Fusión de oligonucleótidos cortos en presencia de THP(B)

Se estudiaron las transiciones térmicas de los oligonucleótidos cortos [d(ATGCAT)]₂ (Fig. 4A) y [d(GCTTAGC)]₂ (Fig. 4B) en ausencia (cuadrados vacíos) y presencia de 0,5 M (círculos vacíos) y 1,0 M (cuadrados rellenos) de THP (B). Los cambios químicos de RMN del protón C4H5 de [d(ATGCAT)]₂ y del protón G1H8 de [d(GCTTAGC)]₂ se midieron como una función de incremento de temperaturas tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (iii). Los resultados de estos experimentos están representados en las Figs. 4A-B y resumidos en la Tabla 1.

TABLA 1

Oligonucleótido	Tf ° C			
	ADN	ADN-THP(B)		ADM-betaína
		0,5 M	1,0 M	1,0 M
[d(ATGCAT)] ₂	31,5	29,5	28,0	29,2
[d(GCTTAGC)] ₂	48,0	45,0	42,0	-

Como se muestra en la Tabla 1, las temperaturas de fusión de [d(ATGCAT)]₂ y de [d(GCTTAGC)]₂ disminuían en 2°C y en 3°C, respectivamente, en presencia de 0,5 M de THP(B), y en 3,5°C y 6°C, respectivamente, en presencia de 1,0 M de THP(B). Los datos se compararon con la temperatura de fusión de [d(ATGCAT)]₂ en presencia de betaína. La disminución en Tf por la betaína fue sólo de ~ 2°C a concentración de 1,0 M, se necesita aproximadamente una concentración de betaína dos veces mayor para ejercer el mismo descenso de Tf causado por THP(B).

40 Ejemplo 3

Efectos de THP(B) y THP(A) sobre la estabilidad de la ADN polimerasa Taq a elevadas temperaturas

Se estudiaron los efectos de THP(B) y THP(A) sobre la actividad remanente de la ADN polimerasa Taq incubada a elevadas temperaturas para diferentes periodos de tiempo.

Tras 90 minutos de incubación a 95°C, la ADN polimerasa Taq sólo era activa un 30%. La enzima estaba considerablemente estabilizada con la adición tanto de THP(B) como de THP(A). Tras la incubación a 95°C en presencia de 0,5 M de THP(B) o 0,5 M de THP(A), la semi-vida de la polimerasa Taq fue de 70 minutos y 60-90 minutos, respectivamente, en comparación con la semi-vida de 30-40 minutos observada en ausencia del aditivo (no mostrado). Se obtuvieron efectos protectores comparables cuando la ADN polimerasa Taq se incubó a 95°C en presencia de una combinación de THP(A) y THP(B) (resultados no mostrados). Así, THP(B) y/o THP(A) presentes en la mezcla de reacción permiten duplicar los ciclos de PCR sin aumentar la pérdida de la actividad enzimática.

En la Fig. 5 se muestran los resultados de experimentos similares que miden la inactivación térmica de la polimerasa Taq a 97°C en ausencia (círculos rellenos) o presencia de 1 M de THP(B) (cuadrados rellenos), 1 M de THP(A) (cuadrados vacíos) en comparación con 1 M de glicerol (rombos vacíos). La inactivación térmica de la enzima a la elevada temperatura de 97°C fue, como se esperaba, más rápida que la inactivación a 95°C, se observó casi una completa pérdida (>95%) de la actividad enzimática tras 60 minutos de incubación a 97°C sin aditivos. Sin embargo, también los efectos protectores por THP(B) y THP(A) fueron más dramáticos: las actividades remanentes de la polimerasa Taq, tras 30 minutos de incubación a 97°C fueron 40% y 50% en presencia de 1 M de THP(B) o THP(A), respectivamente, en comparación al 10% de actividad remanente en ausencia de aditivos. Como resultado de 60 minutos de incubación a 97°C, la actividad remanente de la polimerasa Taq en ausencia de aditivo fue 5%, mientras que en presencia de 1 M de THP(B) o THP(A) las actividades remanentes fueron 20% y 45%, respectivamente. Los resultados mostrados en la Fig. 5 indican que THP(A) es más eficaz que THP(B) o glicerol en la estabilización de la ADN polimerasa Taq.

Ejemplo 4

PCR en presencia de THP(B)

5 El efecto combinado de THP(B) y THP(A) sobre las temperaturas de fusión del ADN y sobre la actividad y estabilidad de la ADN polimerasa Taq a elevadas temperaturas se siguió bajo condiciones de PCR.

La reacción de PCR se realizó por la ADN polimerasa Taq tal como se describe en Materiales y Métodos, sección (vii), usando como molde ADN genómico total de *Halobacterium marismortui* (65% de GC) y los cebadores 1 y 2 con 28 unidades monoméricas descritos en la sección (i).

En la Fig. 6 están representadas las secuencias de ADN amplificadas producidas por la PCR llevada a cabo a 95°C y 92°C, en ausencia y presencia de 0,5 M de THP(B), respectivamente, que muestran que el rendimiento y la especificidad de la amplificación del ADN está mejorada en presencia de THP(B). A 92°C, las secuencias amplificadas se produjeron sólo en presencia de THP(B), pero no en su ausencia.

El efecto de 1 M de THP(B) en la mezcla tampón de la PCR se presenta en las Figs. 7A-C. Se realizó un ensayo "control" a Td de 95°C en ausencia y presencia de 1,0 M de THP(B) con dos concentraciones de ADN polimerasa Taq, 0,5 y 0,75 unidades en 25 µl de mezcla de reacción de PCR. La presencia de 1,0 M de THP(B) mejoró la amplificación específica de la PCR a Td de 95°C (Fig. 7A). Sin embargo, los resultados más significativos se obtuvieron cuando las temperaturas de desnaturalización del ADN se redujeron de 95°C a 90°C (Fig. 7B) en presencia de 1,0 M de THP(B) (tanto con 0,5 como con 0,75 unidades de ADN polimerasa Taq en 25 µl de mezcla de reacción). En estas condiciones, la secuencia específica amplificada se generó sólo en presencia de THP(B), mientras que no se pudieron detectar indicios de ADN amplificado en ausencia de este aditivo.

Además, cuando la Td se disminuyó a 89°C en presencia de 0,5 unidades de ADN polimerasa Taq en 25 µl de mezcla de reacción, la secuencia amplificada de ADN estaba considerablemente reducida, incluso en presencia de 1,0 M de THP(B), pero no se detectaron indicios de ADN amplificado en ausencia de THP(B) (Fig. 7C).

Ejemplo 5

Fusión del ADN en presencia de prolina

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de prolina sobre el perfil de fusión del ADN de timo de ternera (42% de GC). Los experimentos de fusión se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, sección (ii), en ausencia o presencia de 2 M, 3,5 M, 5 M y 6,2 M de prolina.

Como se muestra en la Fig. 8A, la adición de prolina disminuyó significativamente la temperatura de fusión del ADN y afiló su perfil de transición. La temperatura de fusión del ADN en solución acuosa, 62°C, disminuyó a 27°C en presencia de 6,2 M de prolina.

El efecto de la prolina sobre las temperaturas de fusión del ADN se examinó sobre diferentes ADNs con diferentes composiciones base, tales como ADNs de *Micrococcus lysodeikticus* y *Clostridium perfringens* (72% y 26% de GC, respectivamente), ADN de timo de ternera (42% de GC) y sobre poli(dA-dT) sintético. Como muestra la Fig. 8B, Las temperaturas de fusión (Tf) de los diferentes ADNs disminuyeron en presencia de una concentración 6,2 M de prolina en la mezcla de incubación. El intervalo de fusión del ADN con contenido en GC del 72% es aproximadamente 5°C superior que aquel con contenido en GC de 42% y 26%, mientras que el poli (dA-dT) se fusiona a aproximadamente 15°C por debajo.

El efecto de la concentración creciente de prolina como se representa en la Fig. 9A sobre los cuatro ADNs revela que el efecto era pronunciado para los ADNs ricos en GC. Mientras que el oligonucleótido poli (dA-dT) no exhibía ningún cambio en la temperatura de fusión en presencia de 1-5 M de prolina, se dio un pequeño efecto en el intervalo de 5-6,2 M de prolina. La prolina a casi 6,2 M casi eliminó la dependencia de composición de pares de bases de la fusión térmica del ADN. Como se muestra en la Fig. 9A, en presencia de 6,2 M de prolina, todos los ADNs con un amplio intervalos de contenido en GC se funden a un intervalo de temperatura muy estrecho (25-32°C), mientras que en ausencia de prolina, las temperaturas de fusión estaban en el intervalo de 38 a 78°C.

La Fig. 9B representa los cambios en dTf/dGC como una función de la concentración de prolina. Está presente una correlación lineal para la concentración de prolina de hasta 5 M.

Ejemplo 6

Actividad de la polimerasa Klenow en presencia de prolina

Para estudiar el efecto de 5.0 M de L-prolina sobre la actividad de la ADN polimerasa Klenow, los experimentos se llevaron a cabo tal como se describen en Materiales y Métodos, sección (iv), en presencia de diferentes concentraciones de MgCl₂: 6,7 mM, 10,0 mM y 15,0 mM de MgCl₂.

ES 2 323 561 T3

Como se muestra en la Fig. 10, la L-prolina sólo disminuyó ligeramente la actividad de la ADN polimerasa Klenow. La actividad de la enzima permaneció lo suficientemente alta, particularmente a 10.0 (barra rayada, centro) y a 15.0 mM de MgCl₂ (barra rayada, derecha).

5 Ejemplo 7

El efecto de 5,0 M de prolina sobre la estabilidad de la ADN polimerasa Klenow a 65°C

Se midió la actividad remanente de la ADN polimerasa Klenow incubada a 65°C en presencia de 5,0 M de prolina, 10 5.0 M de glicerol o sin aditivos, como se describe en; Materiales y Métodos, sección (vi). Como muestra la Fig. 11, la ADN polimerasa Klenow a 65°C tiene una semi-vida de menos de un minuto sin aditivos (círculos rellenos), 3 minutos en presencia de 5,0 M de glicerol (triángulos rellenos) y 21 minutos en presencia de 5,0 M de prolina (rombos vacíos).

Ejemplo 8

15 *PCR en presencia de prolina, usando ADN polimerasa Klenow*

Los efectos combinados de la prolina en la estabilidad de la ADN polimerasa Klenow a elevadas temperaturas y sobre la etapa de temperatura de desnaturalización del ADN, permitió un diseño de éxito de condiciones de PCR 20 ciclada para esta enzima. La PCR se realizó por la ADN polimerasa Klenow como se describe en Materiales y Métodos, sección (viii).

La amplificación por PCR de un fragmento de 349 pares de bases (66,5% en GC) del ADN genómico de *Halo-* 25 *bacterium marismortui* (desde la posición 2546 hasta 2843) se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 25 µl que contiene 100 ng del ADN molde, 0,12 nM de cada uno de los cebadores 5 y 6 con 30 unidades monoméricas descritos en la sección (i) de más arriba, 0,9 mM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4 a 25°C) y 15 mM de acetato de magnesio. El tampón Tris-HCl, el ADN molde, los dNTP, los cebadores y el acetato de magnesio se añadieron a microtubos de PCR de soluciones reserva, se evaporaron hasta secarse por vacío rápido y se disolvieron en 22 µl 30 de una solución de prolina-glicerol, que contiene 5,5 M de L-prolina en una solución 12,5% p/v de glicerol en agua. La polimerasa Klenow (10 unidades/µl, el tampón de almacenamiento contiene 50% p/v de glicerol) y, con el fin de mantener constante la concentración de glicerol en las mezclas de PCR, las alícuotas de la solución de glicerol en agua (50% p/v de glicerol) se añadieron durante la primera etapa del apareamiento del cebador.

Como muestra la Fig. 12, los carriles 1. y 2. se añadieron 1,0 µl de polimerasa Klenow (10 unidades) y 2,0 µl de 35 solución de glicerol, y en los carriles 3. y 4. se añadieron 1,5 µl de polimerasa Klenow (15 unidades) y 1,5 µl del glicerol. La concentración final de L-prolina en todas las mezclas de PCR fue de 4,85 M y de glicerol fue 17% p/v. Todas las reacciones de PCR se probaron en una máquina MJ Research PCT-100 equipada con un bloque normal (la tasa de incremento es de 1°C por segundo). Las mezclas de reacción se precalentaron durante 3 minutos a 75°C, y 40 a luego se sometieron a 35 ciclos térmicos como sigue: a) 20 segundos de incubación a 70°C; b) 4 minutos de incubación a 37°C. Los productos de reacción se probaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Los resultados mostrados en la Fig. 12 revelan que la concentración de prolina en el intervalo de 3-5,5 M es suficiente para conferir estabilidad a la ADN polimerasa Klenow y para llevar a cabo con éxito un protocolo de PCR.

45 Ejemplo 9

PCR en presencia de prolina, usando ADN polimerasa Taq

La Fig. 13 muestra la PCR, usando ADN polimerasa Taq, realizada en ausencia y en presencia de 1,0 M de prolina, 50 como se describe en Materiales y Métodos, sección (ix). La adición de 1,0 M de prolina a la mezcla de reacción no afectó al rendimiento de la PCR a la temperatura de desnaturalización de 95°C y permitió una PCR de éxito a temperatura de desnaturalización reducida, a saber 91°C.

Ejemplo 10

55 *PCR en presencia de prolina, usando una mezcla de ADN polimerasas Klentaq1 y Pfu*

La PCR se realizó en presencia de 4,0 M de prolina, usando una mezcla de ADN polimerasas Klentaq1 y Pfu, como se describe en Materiales y Métodos, sección (x). Las mezclas de reacción se precalentaron durante 1 minuto 60 a sus respectivas temperaturas de desnaturalización (77°C y 75°C), y luego se sometieron a 35 ciclos térmicos como sigue: (i) 30 segundos de incubación a 77°C p 75°C (etapa de desnaturalización); (ii) 90 segundos de incubación a 44°C (etapa de apareamiento del cebador); y (iii) 7 minutos de incubación a 65°C (extensión del cebador).

Como muestra la Fig. 14, hay una clara correlación entre la concentración de la prolina en la mezcla y la tempera- 65 tura mínima de desnaturalización. Así, para las condiciones arriba mencionadas, la concentración de 4.0 M de prolina fue suficiente para una PCR de éxito a la temperatura de desnaturalización de 77°C, pero no a la de 75°C.

ES 2 323 561 T3

Referencias

1. **Barnes**, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2216-2220.

5

2. **Cheng**, S., **C. Fockler**, W.M. **Barnes** and R. **Higuchi** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5695-5699.

3. **Comey**, C.T. J.M. **Jung** and B. **Budowle** (1991) *BioTechniques* 10, 60-61.

10

4. **Filichkin**, S.A. and S.B. **Gelvin** (1992) *BioTechniques* 12, 828-830.

5. **Galinski**, E.A., H.P. **Pfeifer** and H.G. **Truper** (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 135-139.

15

6. **Gelfand**, D.H. and **White** (1989) in PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, H.A., ed) pp. 17-22, *Stockton Press. New York*.

7. **Han**, J. *et al.* (1994) *Nucleic Acids Research* 22, 1735-1740.

20

8. **Inbar**, L. and A. **Lapidot** (1988a) *J. Bacteriol.* 170, 4055-4064.

9. **Inbar**, L. and A. **Lapidot** (1988b) *J. Biol. Chem* 263, 46014-16022.

10. **Inbar**, L. and A. **Lapidot** (1991) *J. Bacteriol.* 173, 7790-7801.

25

11. **Inbar**, L., F. **Frolow** and A. **Lapidot** (1993) *Eur. J. of Biochem.* 214, 897-906.

12. **Kieleczawa**, J., **Dunn**, J.J. and **Studier**, F.W. (1992) *Science* 258, 1787-1791.

30

13. **Lapidot**, A., **Ben-Asher**, E. and **Eisenstein**, M. (1995) *FEBS Letters* 367, 33-38.

14. **Malin**, G.M. and A. **Lapidot** (1996) *J. Bacteriol.* 178, 385-395.

35

15. **Melchior**, W.B., Von **Hippel**, P.H. Jr., and Von **Hippel**, P.H. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 298-302

16. **Mcpherson**, M.J., P. **Quirke** and G.R. **Taylor** (1992) in PCR. A practical approach. (**Mcpherson**, M.J., **Quirke** P. and **Taylor**, G.R., Editors), *IRL Press. Oxford University Press*.

17. **Mytelka**, D.S. and M.J. **Chamberlain** (1996) *Nucl. Acids Res.* 24, 2774-2781.

40

18. **Pomp**, D. and J.F. **Medrano** (1991) *BioTechniques* 10, 58-59.

19. **Rajendrakumar**, S.V., **Suryanarayana**, T., and **Reddy**, A.R. (1997) *FEBS Letters* 410, 201-205.

45

20. **Rees**, W.A., T.D. **Yager**, J. **Korte** and P.H. Von **Hippel** (1993) *Biochemistry* 32, 137-144.

50

21. **Varadaraj**, K. and D.M. **Skinner** (1994) *Gene* 140, 1-5.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar una reacción de extensión cíclica del cebador que comprende las etapas de:

5 (i) poner en contacto un ADN molde que comprende una secuencia de nucleótidos diana con al menos un cebador oligonucleotídico complementario para una secuencia nucleotídica en el extremo 3' de dicha secuencia diana, bajo condiciones que permiten el apareamiento de dicho cebador con su secuencia nucleotídica complementaria sobre dicha secuencia diana, en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, 2-metil-4-carboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(B)] y mezclas de los mismos, para disminuir la temperatura de fusión de dicho ADN molde y/o dicho cebador;

10 (ii) llevar a cabo una extensión, mediada por polimerasa, de dicho cebador sobre dicha secuencia de nucleótidos diana en presencia de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), 2-metil-4-carboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidina [THP(A)] y mezclas de los mismos, para estabilizar dicha polimerasa; y

15 (iii) repetir las etapas (i) y (ii) una pluralidad de veces, donde la etapa (i) está precedida por la desnaturalización térmica del ADN a una temperatura adecuada tanto para separar dicho ADN molde en sus hebras como para separar el cebador extendido por la polimerasa de la etapa (ii) de su secuencia de nucleótidos diana complementaria, siendo dicha temperatura una temperatura en la que la polimerasa usada en la etapa (ii) es estable;

20 donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M; y

25 donde en presencia de prolina a solas se usa una polimerasa no termoestable para realizar la reacción de extensión cíclica del cebador y la prolina permite funcionar a temperaturas a las cuales la polimerasa no termoestable podría, por el contrario, ser sensible a inactivación térmica,

30 obteniendo así una extensión específica del cebador de alto rendimiento sobre dicha secuencia de nucleótidos diana del ADN molde.

35 2. El método según la reivindicación 1 para determinar una secuencia nucleotídica de un ADN diana, donde en la etapa (i) la secuencia diana del ADN molde es una secuencia de nucleótidos que hay que secuenciar, y la extensión mediada por polimerasa del cebador en la etapa (ii) se lleva a cabo en presencia de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y en presencia de una cantidad minúscula de una cualquiera de ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP, antes de la determinación de la secuencia nucleotídica del ADN diana.

40 3. El método según la reivindicación 2, donde dGTP es sustituido por 7-deaza-dGTP.

45 4. El método según la reivindicación 1 para amplificar una secuencia de nucleótidos diana por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde en la etapa (i) la secuencia diana del ADN molde es una secuencia de nucleótidos que hay que amplificar y el ADN molde se pone en contacto con dos cebadores oligonucleotídicos complementarios para las secuencias nucleotídicas en los extremos 3' de dicha secuencia de nucleótidos diana y su hebra opuesta; en la etapa (ii) se lleva a cabo una extensión, mediada por polimerasa, de los cebadores apareados de la etapa (i); las etapas (i)-(ii) se repiten una pluralidad de veces, siendo la última etapa la etapa (ii),

generando así múltiples copias de la secuencia de nucleótidos diana.

50 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho ADN molde es un ADN rico en GC.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la polimerasa en la etapa (ii) es una ADN polimerasa termoestable.

55 7. El método según la reivindicación 6, donde dicha ADN polimerasa termoestable es polimerasa Taq, ADN polimerasa Klenoq1 o polimerasa Pfu.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la polimerasa en la etapa (ii) es una ADN polimerasa no termoestable.

60 9. El método según la reivindicación 8, donde dicha ADN polimerasa no termoestable es seleccionada de ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T4, Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, transcriptasas reversas, ADN polimerasa Bca, ADN polimerasa Bst y mutantes de estas polimerasas.

65 10. Un método para disminuir la temperatura de fusión del ADN de doble hebra (ADNdh) que comprende añadir a la mezcla de incubación de dicho ADNdc 0,5-4 M de THP(B).

ES 2 323 561 T3

11. Un método para incrementar la estabilidad de una ADN polimerasa a elevadas temperaturas que comprende añadir a la mezcla de incubación de dicha polimerasa un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), THP (A) y mezclas de los mismos, donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M.

12. Un kit para determinar una secuencia nucleotídica de un ADN diana según el método de la reivindicación 2 o 3 que comprende en envases separados: (a) los reactivos necesarios para secuenciar el ADN, y (b) prolina.

13. Un kit para determinar una secuencia nucleotídica de un ADN diana según el método de la reivindicación 2 o 3 que comprende en envases separados: (a) los reactivos necesarios para secuenciar el ADN, y (b) THP(B) o una mezcla de THP(B) y THP(A).

14. Un kit para amplificar una secuencia de nucleótidos diana según el método de la reivindicación 4 que comprende en envases separados: (a) los reactivos necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa, y (b) prolina.

15. Un kit para amplificar una secuencia de nucleótidos diana según el método de la reivindicación 4 que comprende en envases separados: (a) los reactivos necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa, y (b) THP(B) o una mezcla de THP(B) y THP(A).

16. Uso de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), THP(A) y mezclas de los mismos como un aditivo en una reacción para determinar una secuencia nucleotídica, donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M.

17. Uso de un agente osmoprotector seleccionado de prolina, THP(B), THP(A) y mezclas de los mismos como un aditivo en una mezcla de reacción de PCR, donde la prolina está presente en una cantidad de 3,0-5,5 M cuando se usa a solas y en una cantidad de 1-5 M cuando se usa en una mezcla, THP(B) está presente en una cantidad de 0,5-3,5 M y THP(A) está presente en una cantidad de 0,5-3 M.

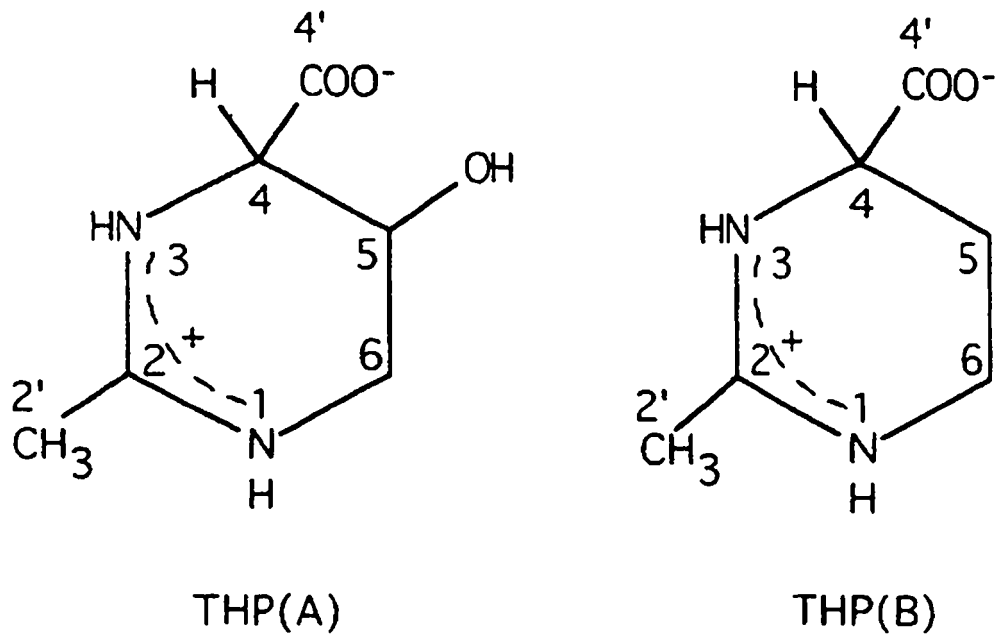


Fig. 1

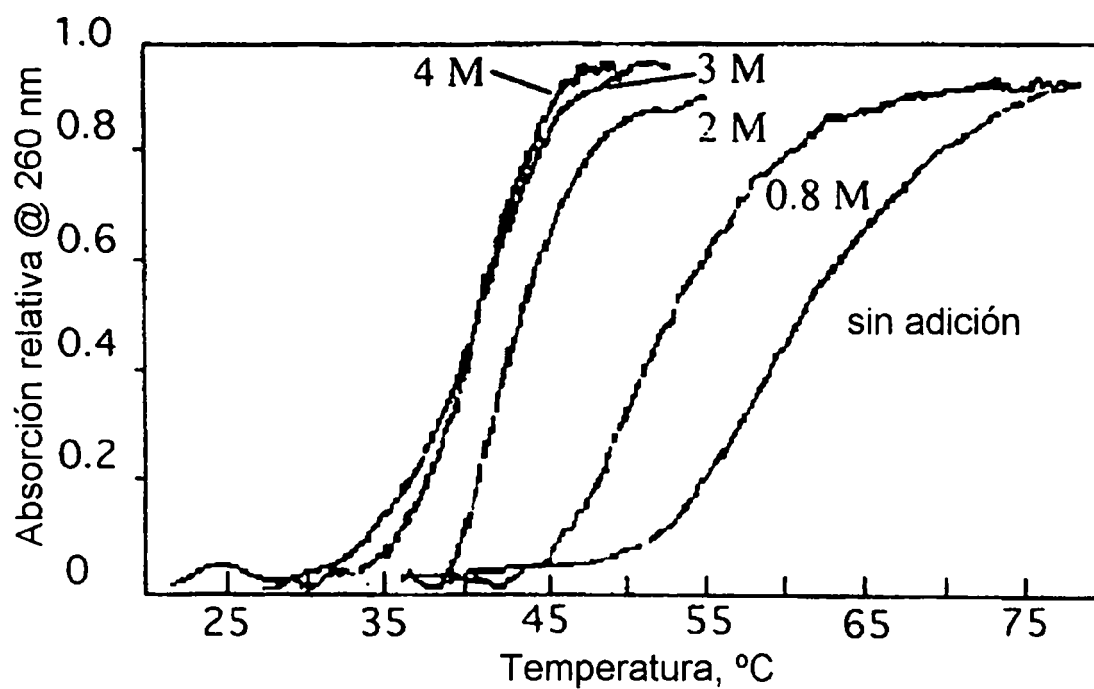


Fig. 2

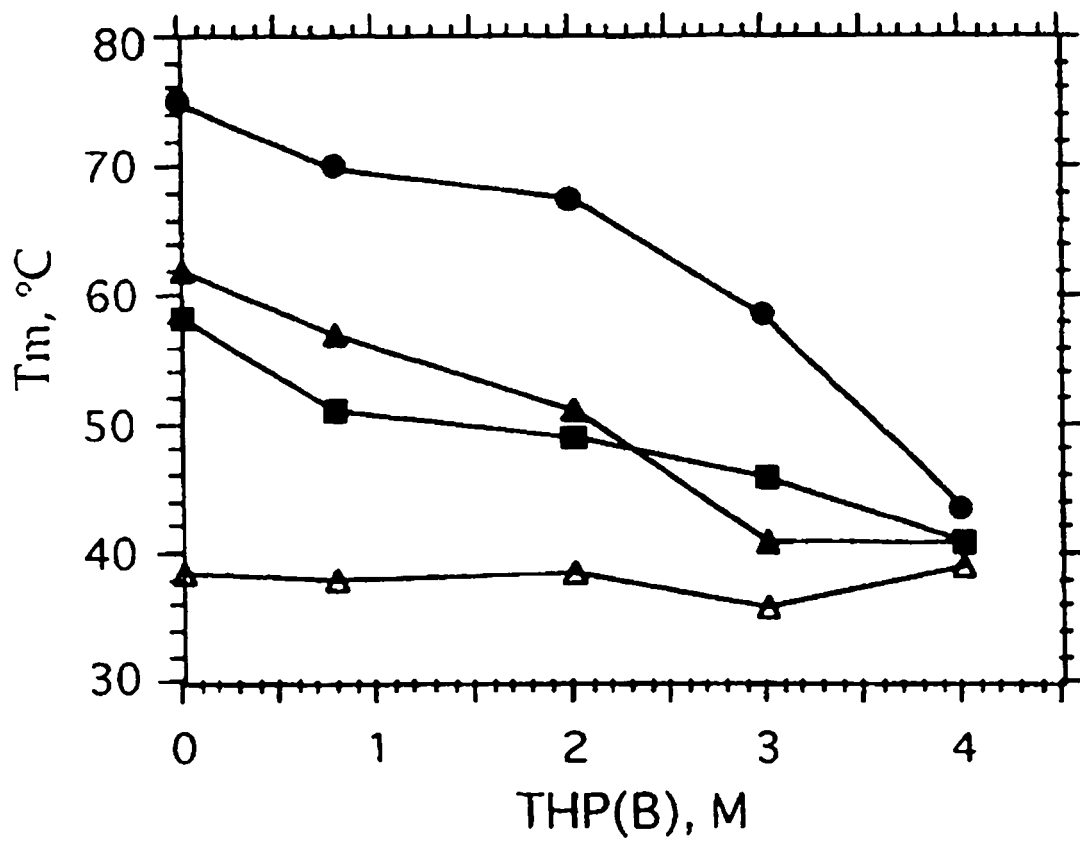


Fig. 3

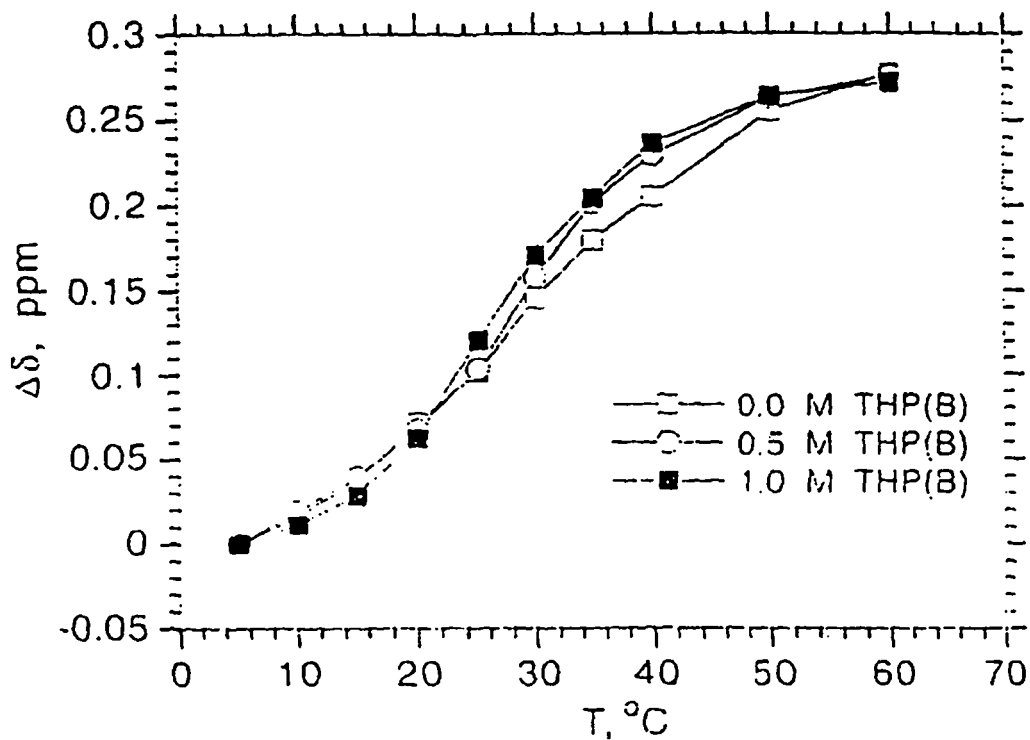


Fig. 4A

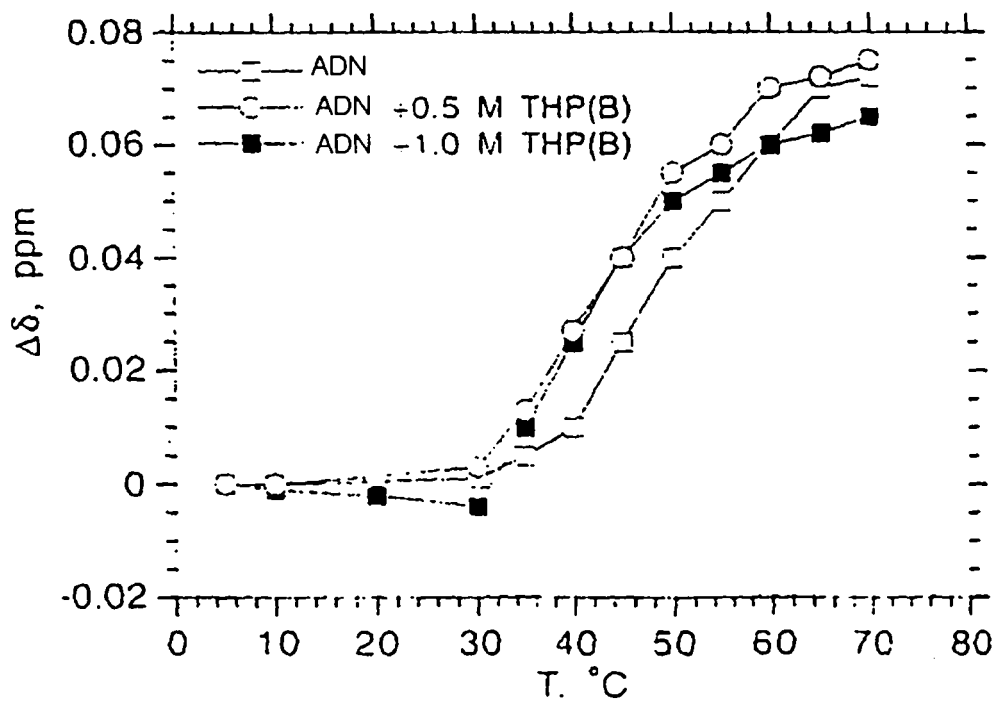


Fig. 4B

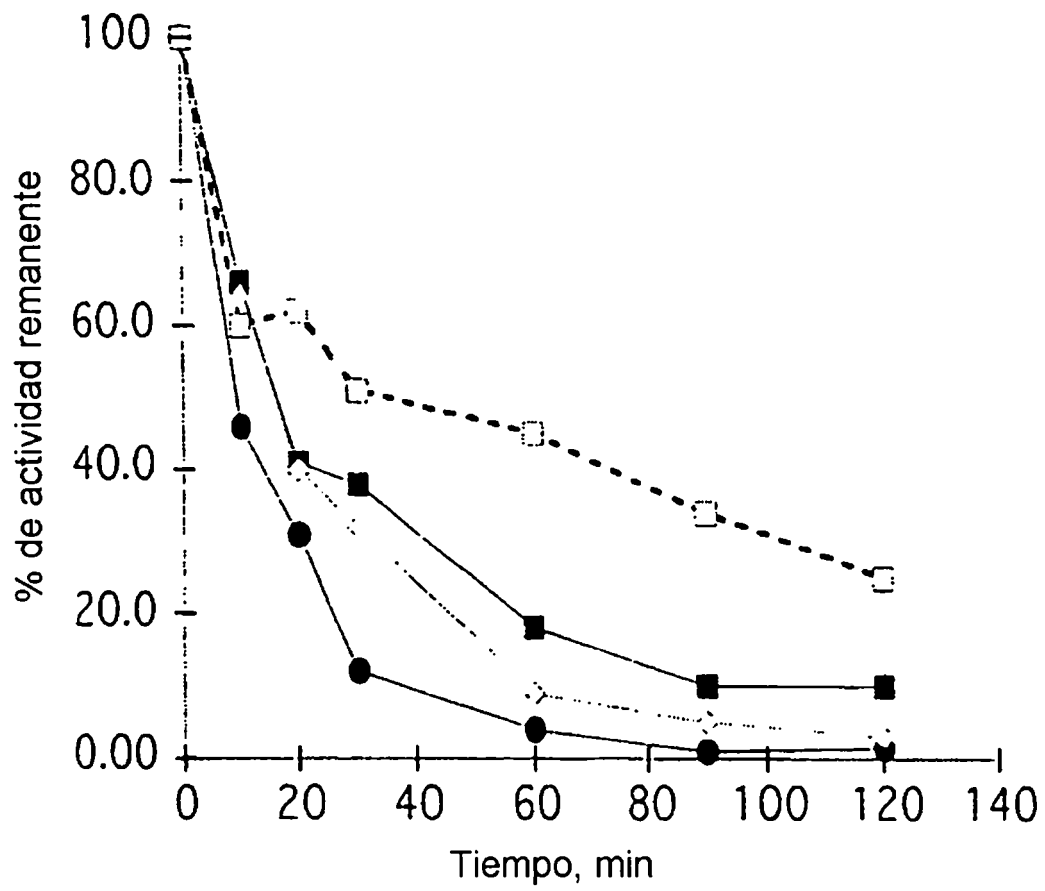


Fig. 5

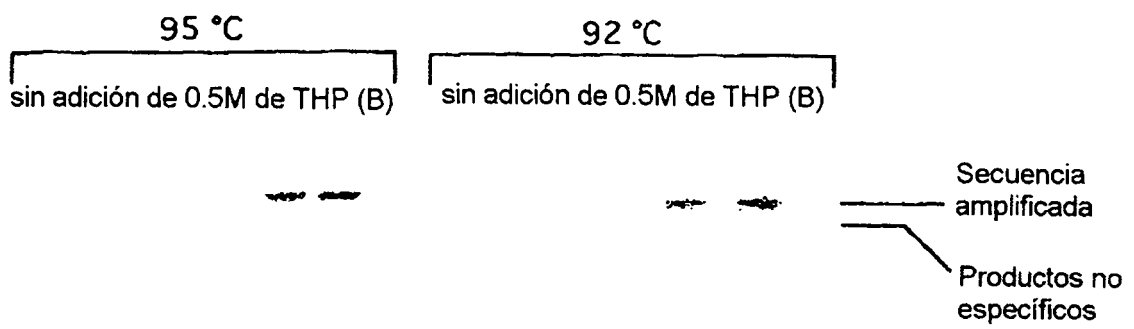


Fig. 6

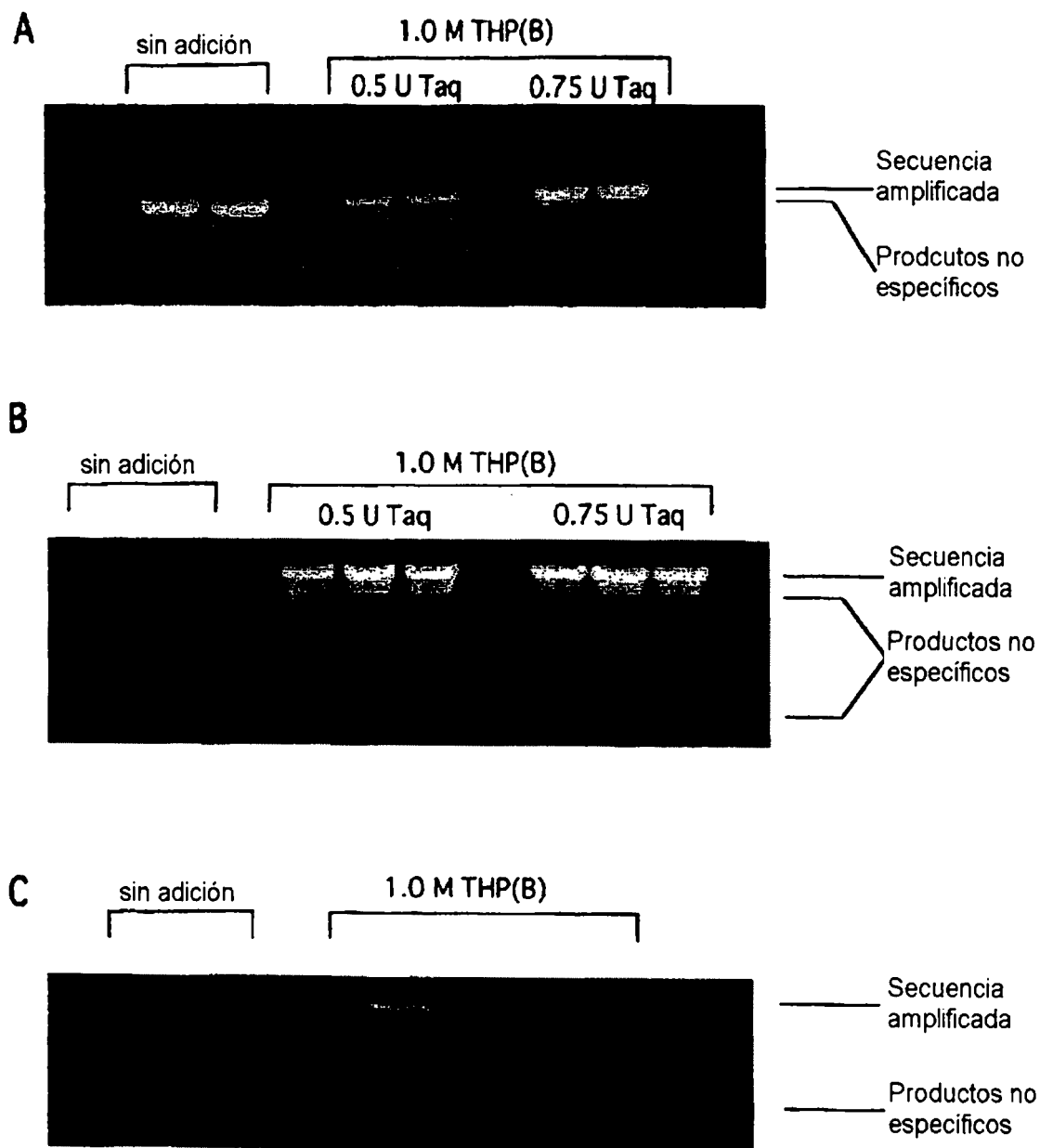


Fig. 7

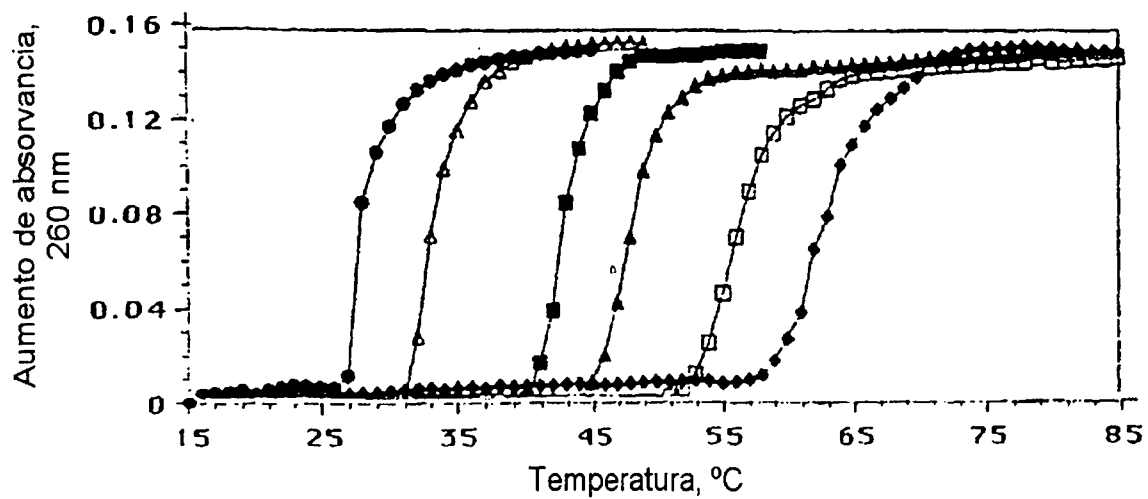


Fig. 8A

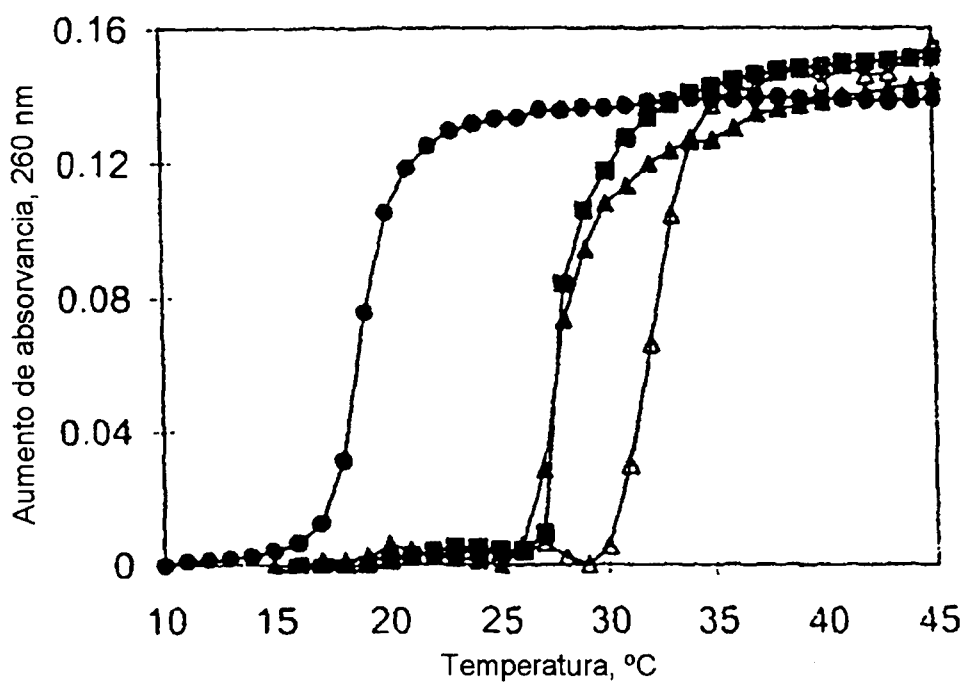


Fig. 8B

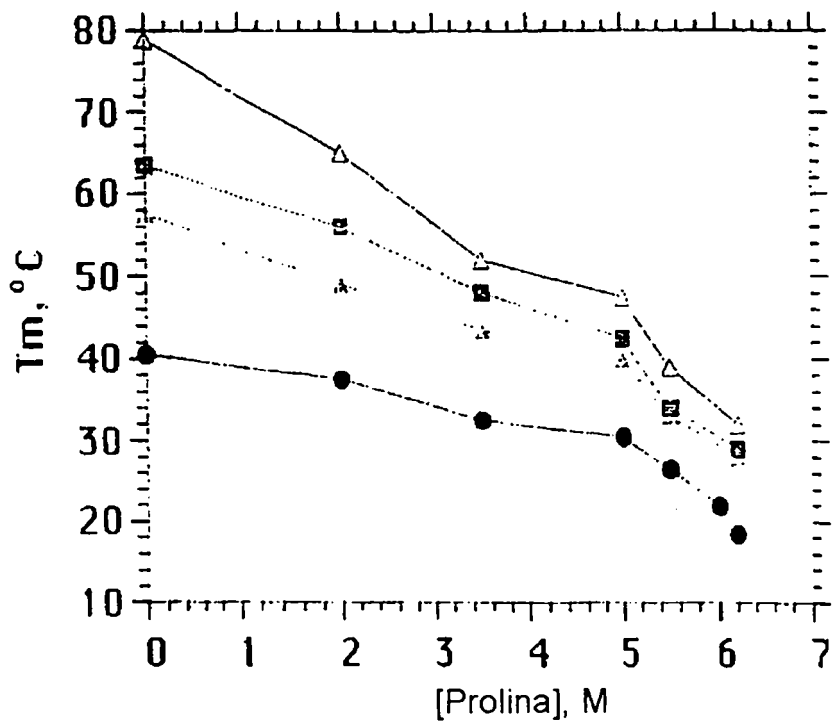


Fig. 9A

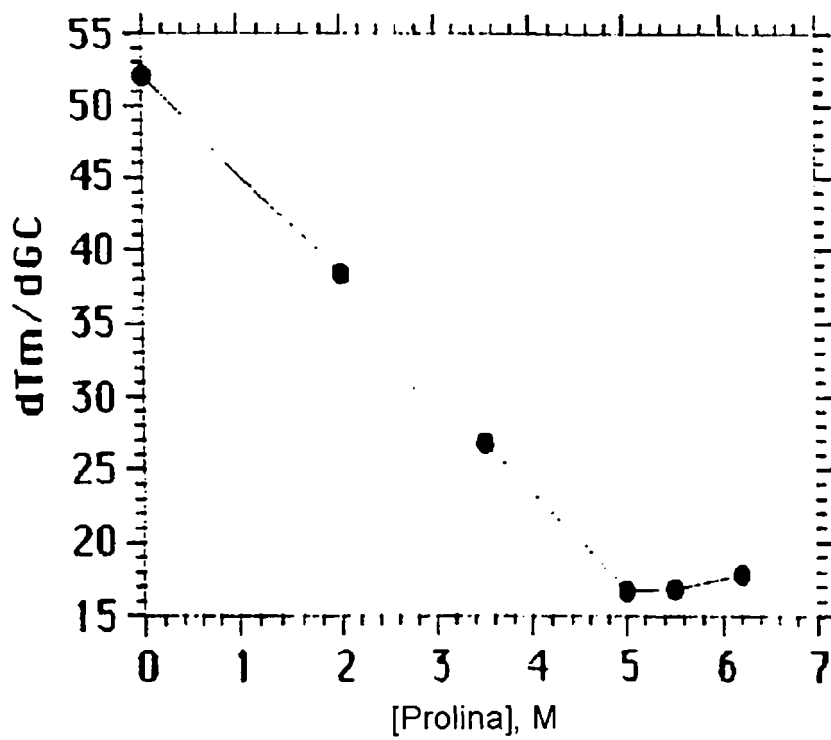


Fig. 9B

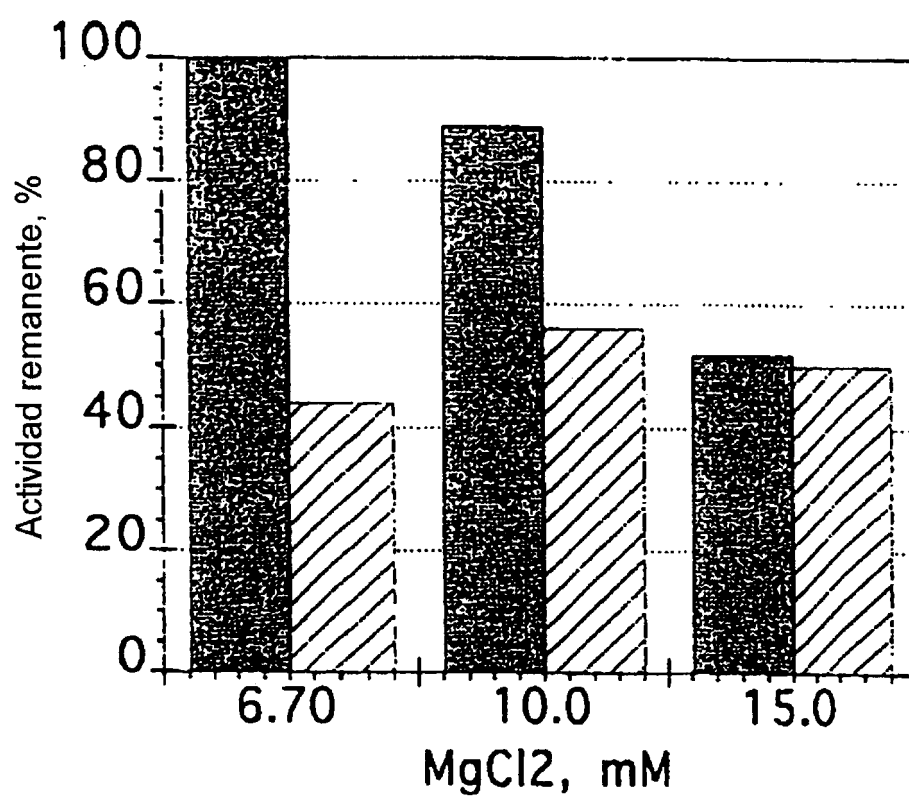


Fig. 10

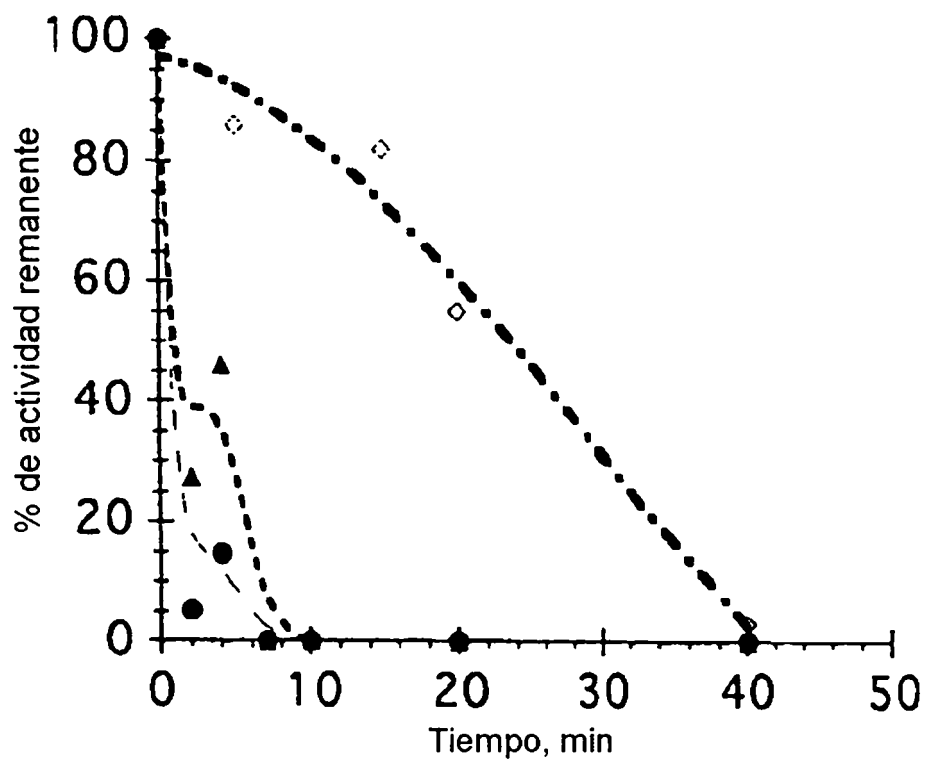


Fig. 11

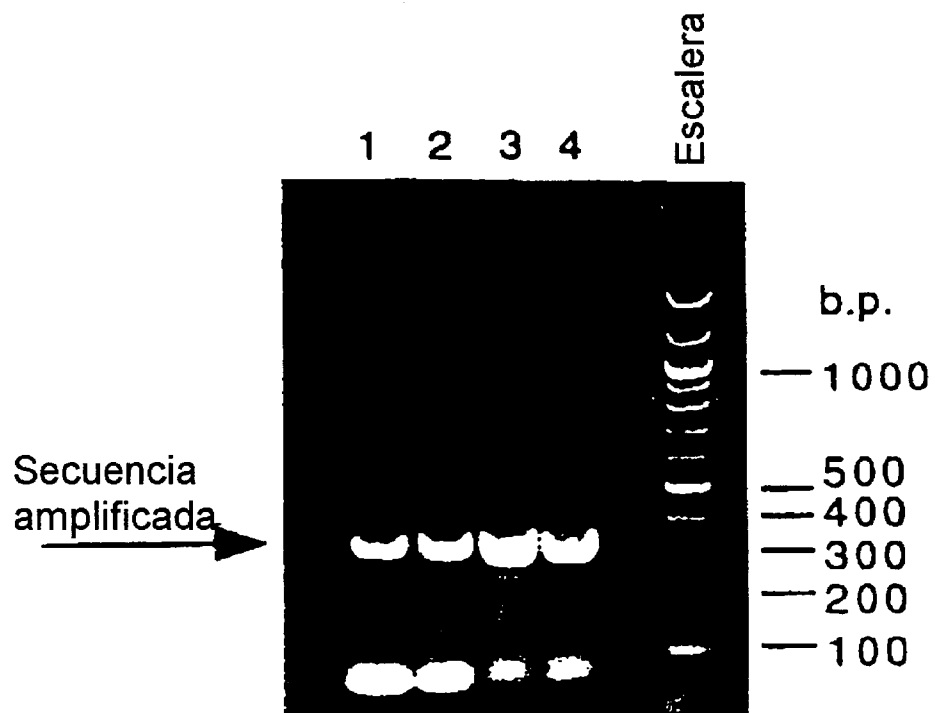


Fig. 12

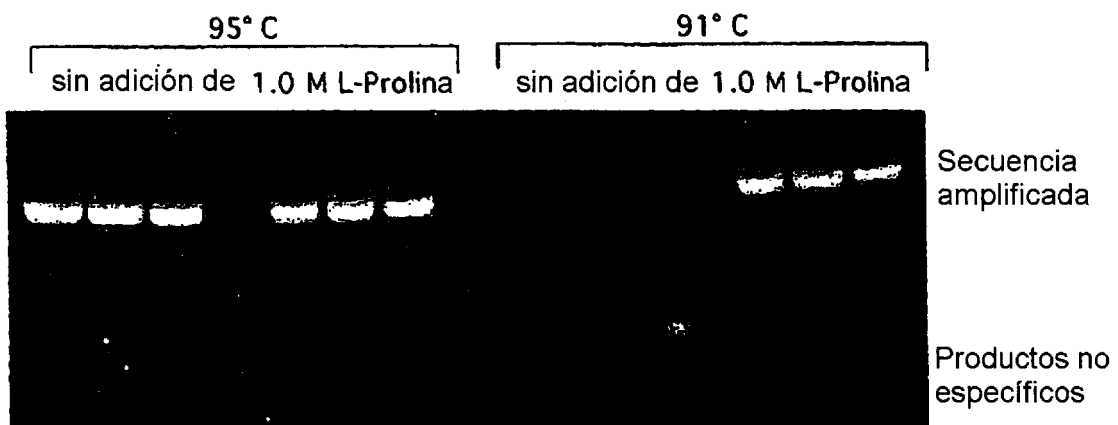


Fig. 13

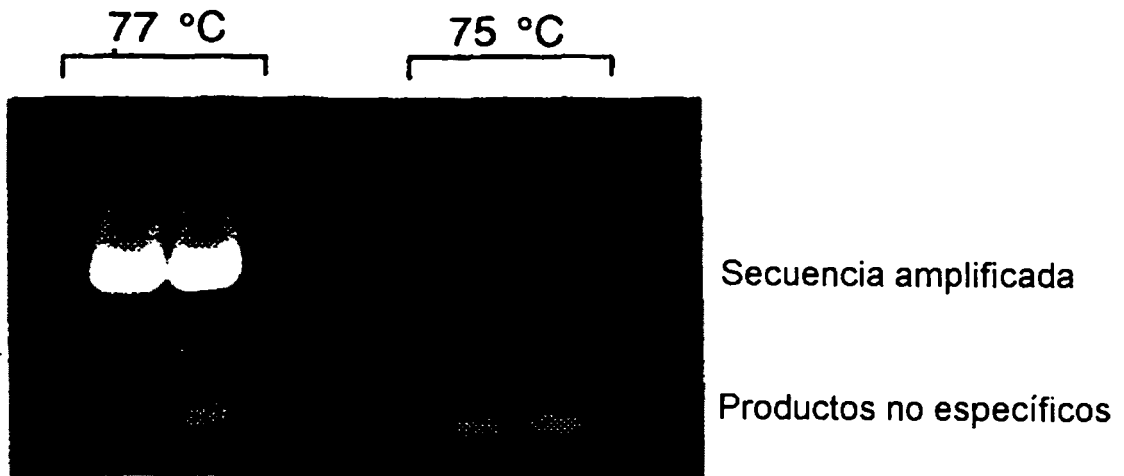


Fig. 14