

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ METODO PARA LA REPLICACION, AMPLIFICACION O SECUENCIACION
DE UN ADN MOLDE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)

DOMICILIO _____ MADRID, ESPAÑA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180680- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 52

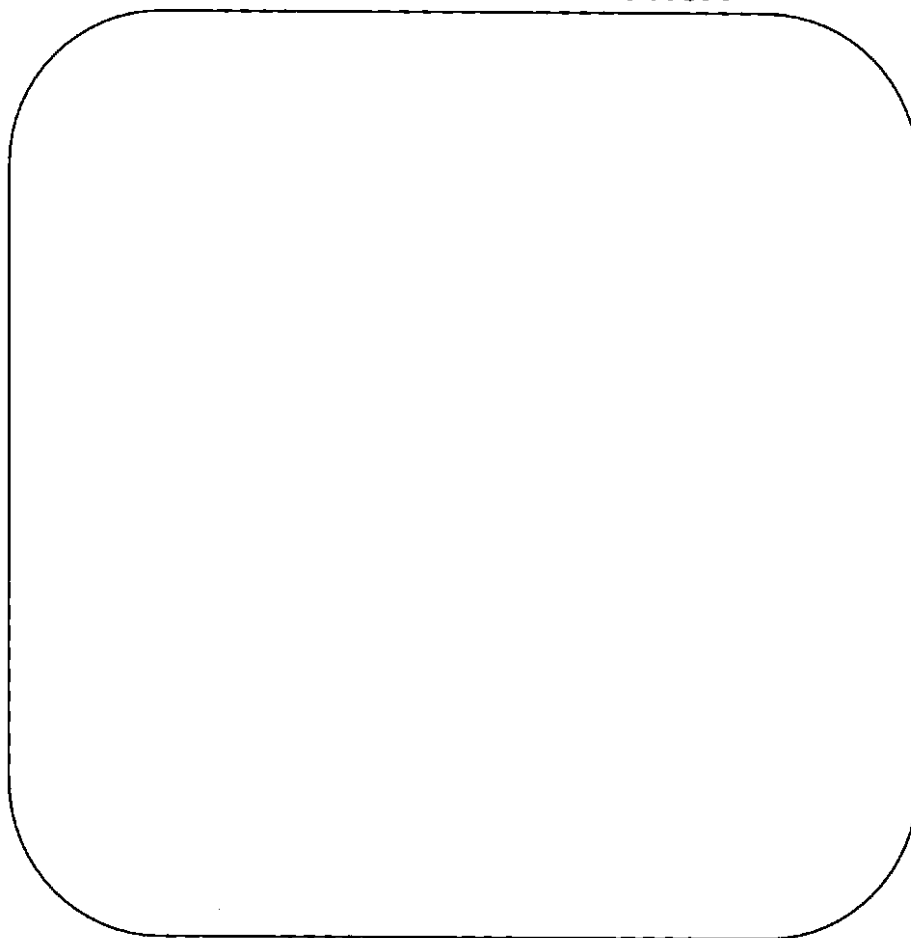
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:	
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) Sociedad constituida y existente bajo las leyes de España. Dirección: C/Serrano, 117, E-28006 Madrid, España Domicilio: Madrid, España IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia. IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 35.456.344 T.P 23.555
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Margarita SALAS FALGUERAS Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev) C/Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049, Madrid, España 2. José Miguel DE VEGA Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev) C/Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049, Madrid, España 3. José Ma LAZARO BOLOS Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev) C/Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049, Madrid, España 4. Luis BLANCO DAVILA Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev) C/Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049, Madrid, España 5. Mario MENCIA CABALLERO Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev) C/Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049, Madrid, España
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/ES2010/070456</u> Fecha: <u>02 de julio de 2010</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2011/000998 A3</u> Fecha: <u>06 de enero de 2011</u>	

6	Título (54) METODO PARA LA REPLICACIÓN, AMPLIFICACIÓN O SECUENCIACIÓN DE UN ADN MOLDE		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C12Q 001/068</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>ES</u>	(32) Fecha <u>02 de julio de 2009</u>
			(31) Número de Solicitud <u>P 200930412</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>11-125060</u> Fecha: <u>23 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-125061</u> Fecha: <u>23 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-125021</u> Fecha: <u>23 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-122613</u> Fecha: <u>16 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-123935</u> Fecha: <u>21 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-125036</u> Fecha: <u>23 de diciembre de 2011</u>		
10	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.oo. ☒ Comprobante de pago por 30 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$810.000.oo. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☐ Poder, si fuere el caso de . ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/000998 A3 ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso. ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☐ Arte final 12x12 ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS		

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/000998 A3

2.

Descripción:

Páginas 21 en español

Reivindicaciones: Número (40)

Figuras: Número (5)

3. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

4. ☒ Extracto de publicación.

5. ☒ Listado de secuencias

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/000998 A3

(43) Fecha de publicación internacional
6 de enero de 2011 (06.01.2011)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070456

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de julio de 2010 (02.07.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200930412 2 de julio de 2009 (02.07.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SALAS FALGUERAS, Margarita [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). DE VEGA JOSÉ, Miguel [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). LAZARO BOLOS, José M^a [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). BLANCO DAVILA, Luis [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). MENCIA CABALLERO, Mario [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:

21 de julio de 2011

(54) Title: METHOD FOR THE REPLICATION, AMPLIFICATION OR SEQUENCING OF A DNA TEMPLATE

(54) Título : MÉTODO PARA LA REPLICACIÓN, AMPLIFICACIÓN O SECUENCIACIÓN DE UN ADN MOLDE

(57) Abstract: The invention relates to the field of biotechnology, specifically to a method for carrying out the replication, amplification or sequencing of a desoxyribonucleic acid with a ϕ 29 DNA polymerase. According to said method, said polymerase is incubated in a reaction mixture comprising polyoxyethylenated sorbitane monolaurate (Tween 20) in a concentration of between 0.003 and 0.01%, together with an ammonium salt that can be 30-60 mM ammonium sulfate, 60-120 mM ammonium chloride or ammonium acetate, among other components. The invention also relates to a kit for carrying out said method.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la Biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo ϕ 29, que comprende incubar dicha polimerasa en una mezcla de reacción que comprenda monolaurato de sorbitán polioxi-etileno (Tween 20) a una concentración del 0,003-0,01%, junto con una sal amonio, ya sea sulfato de amonio 30-60 mM, ya cloruro de amonio o acetato de amonio 60-120 mM, entre otros componentes. También se incluye un kit para llevar a cabo dicho método.



WO 2011/000998 A3

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/000998 A2

(43) Fecha de publicación internacional
6 de enero de 2011 (06.01.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2010/070456

(22) Fecha de presentación internacional: 2 de julio de 2010 (02.07.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad: P 200930412 2 de julio de 2009 (02.07.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SALAS FALGUERAS, Margarita** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **DE VEGA JOSÉ, Miguel** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **LAZARO BOLOS, José M^a** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **BLANCO DAVILA, Luis** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **MENCIA CABALLERO, Mario** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev),
- C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

 - sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR THE REPLICATION, AMPLIFICATION OR SEQUENCING OF A DNA TEMPLATE

(54) Título : MÉTODO PARA LA REPLICACIÓN, AMPLIFICACIÓN O SECUENCIACIÓN DE UN ADN MOLDE

(57) Abstract: The invention relates to the field of biotechnology, specifically to a method for carrying out the replication, amplification or sequencing of a desoxyribonucleic acid with a ϕ 29 DNA polymerase, and to a kit for carrying out said method.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo ϕ 29 y a un kit para llevar a cabo dicho método.

WO 2011/000998 A2

Método para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología.

- 5 Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ y a un kit para llevar a cabo dicho método.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

La única enzima requerida por el bacteriófago $\phi 29$ para replicar su genoma es su ADN polimerasa, una proteína monomérica de 66 KDa, capaz de catalizar tanto la iniciación de la replicación como la elongación de la cadena sintetizada. Para la iniciación, esta polimerasa se une a una proteína denominada "terminal" (TP), reconoce el extremo del ADN de $\phi 29$ y cataliza la formación de un complejo covalente TP-dAMP. Tras la polimerización de 10 nucleótidos, se disocia el heterodímero ADN polimerasa/TP y se lleva a cabo la elongación de la cadena naciente de ADN.

- 20 Las ADN polimerasas replicativas requieren la interacción con proteínas accesorias que estabilizan la unión entre la enzima y el ADN (Kuriyan y O'Donnell. J Mol Biol. 1993; 234: 915-925). Por otro lado, dichas ADN polimerasas necesitan acoplar la polimerización al desplazamiento de la cadena de ADN que no está siendo copiada, para lo cual requieren su asociación funcional a proteínas tipo helicasa. En este sentido, la ADN polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ presenta varias características funcionales intrínsecas que la hacen única:

- 30 a) Elevada procesividad (definida como el número de nucleótidos incorporados por evento de unión).

- b) Alta capacidad de desplazamiento de cadena, lo que le permite replicar

el genoma de dicho bacteriófago en ausencia de proteínas accesorias tipo helicasa. Estas dos características, procesividad y desplazamiento de cadena permiten que la ADN polimerasa de $\phi 29$ sea capaz de sintetizar cadenas de ADN de más de 70 kb de longitud (Blanco et al. J Biol Chem. 1989; 264: 8935-8940).

c) Alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena (Esteban et al. J Biol Chem. 1993; 268: 2719-2726).

- 10 Todas estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos de procesos isotérmicos (a temperatura constante) para la amplificación de ADN de doble cadena (ADNbc), basados en el uso de esta polimerasa. En una configuración simple, la capacidad de la ADN polimerasa de $\phi 29$ para usar ADN de cadena sencilla (ADNmc) circular permite una
- 15 amplificación de ADN por el método del círculo rodante (o, RCA de las siglas en inglés de *rolling-circle amplification*), originando moléculas de ADNmc de gran longitud y que contienen más de 10 copias del molde circular (Blanco et al. J Biol Chem. 1989; 264: 8935-8940; US5001050, US5198543 y US5576204). En el procedimiento de amplificación de ADNbc desarrollado por Amersham
- 20 Biosciences / Molecular Staging (Dean et al. Genome Res. 2001; 11: 1095-1099; Dean et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 5261-5266), la combinación del uso de la ADN polimerasa de $\phi 29$ con el de hexámeros (hexa-nucleótidos) cebadores de secuencias al azar, permiten obtener factores de amplificación de 10^4 - 10^6 partiendo de picogramos de ADN plasmídico circular
- 25 [Templiphi™ de GE Healthcare] o de 10 nanogramos de ADN genómico [Genomiphi™ de GE Healthcare y Repli-G® de Qiagen]. Los productos originados son de alta calidad y pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa, habiéndose demostrado que la ADN polimerasa de $\phi 29$ es la enzima más robusta para este fin. El tampón
- 30 habitual para llevar a cabo las reacciones de amplificación con la ADN polimerasa de $\phi 29$ contiene Tris-HCl (pH 7,5) más distintas concentraciones (en el orden milimolar) de NaCl o KCl y $MgCl_2$ (US20030207267). Sin embargo,

a pesar de la bondad de estos protocolos en situaciones muy diversas, es una necesidad creciente el desarrollar otros que permitan partir de cantidades menores de ADN.

5 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ y a un kit para llevar a cabo dicho método.

10

La ADN polimerasa del fago $\phi 29$ presenta varias características de gran interés para la amplificación de ADN como son: una elevada procesividad sin necesidad del concurso de ninguna proteína accesoria y una alta capacidad de desplazamiento de cadena que le permiten replicar el genoma de dicho bacteriófago en un solo evento de unión al ADN, así como una alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena. Estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos para la amplificación isotérmica de ADN, basados en el uso de esta polimerasa que permiten la obtención de productos de alta calidad que pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa. Sin embargo, existe una necesidad de protocolos que permitan la amplificación de ADN a partir de cantidades menores del mismo. La presente invención responde a esta necesidad mediante el desarrollo de un método de amplificación de ADN que mejora significativamente la especificidad y el rendimiento de la reacción.

20

25

En los ejemplos de esta patente se muestra que la adición simultánea de monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween[®] 20) y una sal de amonio al tampón usado habitualmente para la amplificación con la ADN polimerasa de $\phi 29$, por un lado, evita la amplificación inespecífica de ADN y, por otro, permite la amplificación detectable y específica a partir de cantidades límite de 0,1 femtogramos (fg) de ADN plasmídico y 10 fg de ADN genómico como molde.

30

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:

5

- a) una ADN polimerasa del tipo ϕ 29,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
- c) una sal de amonio,
- d) un tampón,
- 10 e) cloruro magnésico,
- f) un cebador, y
- g) nucleósidos trifosfato.

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un
15 método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende los elementos (a)-(g) mencionados anteriormente y que además comprende una sal de potasio. Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

20

El término "ADN polimerasa", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. Generalmente, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' de un cebador hibridado con una secuencia de ADN molde, y
25 procede en dirección al extremo 5' de la hebra del ADN molde.

El término "ADN polimerasa del tipo ϕ 29", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier ADN polimerasa que contiene subdominios TPR1 y TPR2 en su dominio de polimerización, que proporcionan a la
30 polimerasa la capacidad de acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento de cadena. Ejemplos de ADN polimerasas del tipo ϕ 29 que pueden ser empleadas en la presente invención se seleccionan de la lista que

comprende las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: ϕ 29, Cp-1, PRD-1, ϕ 15, ϕ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

- 5 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: ϕ 29, Cp-1, PRD-1, ϕ 15, ϕ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

10

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

15

20

El dominio exonucleasa de las ADN polimerasas del tipo ϕ 29 es conocido y puede ser modificado para reducir la actividad exonucleasa reteniendo una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de cadena. Estas ADN polimerasas modificadas son especialmente útiles para secuenciar moléculas largas.

25

30

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 presenta una modificación en el dominio exonucleasa, donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural o "wild type". En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 modificada tiene menos del 1 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural. En una realización aún más preferida, la ADN

polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

5 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de entre 5 nM y 75 nM. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo $\phi 29$ (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de entre 25 nM y 60 nM. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa
10 del tipo $\phi 29$ (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de aproximadamente 50 nM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado
15 (Tween[®] 20) está a una concentración de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción. En una realización más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el
20 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de aproximadamente 0,025% del volumen total de la reacción. Por "volumen total de la reacción", se entiende el volumen resultante tras la adición del ADN molde a la mezcla de reacción.

25

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

30 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es sulfato de amonio. En una realización más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de

entre 30 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de aproximadamente 45 mM.

5

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es cloruro de amonio. En una realización más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

10

15

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es acetato de amonio. En una realización más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

20

25

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización más preferida, el tampón está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón está a un pH de aproximadamente 7,5.

30

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES. En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización aún más

preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de aproximadamente 7,5.

- 5 En una realización preferida de este aspecto del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 25 mM y 50 mM. En una realización más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 30 mM y 45 mM. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de aproximadamente 40 mM.

- 15 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM. En una realización más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de aproximadamente 50 mM.

- 20 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM. En una realización más preferida, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro magnésico está aproximadamente a 10 mM.

- 25 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de entre 40 mM y 50 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro

magnésico está a una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de 45 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención; el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una
5 concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

10

En una más realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-
15 Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

20 El término "replicación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a partir de un ADN molde.

El término "amplificación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ADN molde.

25

El término "secuenciación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ADN molde.

Por "poner en contacto" se entiende que el ADN molde y la mezcla de reacción
30 se incuban en condiciones de extensión del cebador.

El término "cebador", como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

5

Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse, a la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de deoxinucleótidos en el ADN molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

10

El término "cebador específico", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de deoxinucleótidos en el ADN molde que se quiere amplificar.

15

Por "complementaria" se entiende que el cebador puede hibridar con una región del ADN molde de forma que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferentemente, esa región tiene una complementariedad del 100 % con una región del ADN molde. Esto es, cada nucleótido en la región de complementariedad con el cebador puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en el molde de hebra sencilla. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que cebadores que posean una región con complementariedad menor al 100 % respecto al ADN molde funcionarán para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

20

25

El término "cebador arbitrario" se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde. Por lo general, en el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención se emplea una población de cebadores arbitrarios. El término "cebadores arbitrarios" se refiere

30

a un conjunto de cebadores con una secuencia aleatoria y que se usan para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es específico.

5

En otra realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es arbitrario. Preferiblemente, el cebador arbitrario está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'. Y más preferiblemente, el cebador arbitrario es un oligonucleótido de 6

10 nucleótidos, "hexanucleótido" o "hexámero" protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

15

La expresión "protegido frente a la acción de exonucleasas", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador modificado de forma que es resistente a la degradación nucleolítica por cualquier actividad

exonucleasa 3'-5' presente en la ADN polimerasa.

20

En el método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, puede emplearse más de un cebador, pudiendo emplearse cebadores

específicos y/o arbitrarios.

25

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador está a una concentración de entre 2 μM y 100 μM . En una realización más preferida, el cebador está a una

concentración de entre 20 μM y 80 μM . En una realización aún más preferida, el cebador está a una concentración de entre 40 y 60 μM . En una realización aún más preferida, el cebador está a una concentración de aproximadamente 50 μM .

30

El término "nucleósidos trifosfato", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y tres grupos fosfato.

El término nucleósidos trifosfato incluye desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. Preferiblemente, los desoxinucleósidos trifosfato son dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Aún más preferiblemente, estos cuatro dNTPs
5 están en condiciones equimolares. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 100 μ M y 800 μ M. En una realización más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 200 μ M y 600 μ M. En una realización aún más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato
10 están a una concentración de aproximadamente 500 μ M.

El término nucleósidos trifosfato también incluye didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, ddATP, ddCTP, ddITP, ddUTP, ddGTP, ddTTP, o derivados de los mismos.

15 En algunas realizaciones preferidas del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. El nucleótido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un
20 didesoxinucleósido trifosfato. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

El término “ADN molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se
25 refiere a una molécula de ADN que puede servir como sustrato para la síntesis de una cadena de ADN complementaria; es decir, se refiere a una molécula de ADN que va a ser replicada, amplificada o secuenciada. En una realización preferida el ADN molde es ADN plasmídico. En otra realización preferida, el ADN molde es ADN genómico.

30 La replicación, la amplificación o la secuenciación del ADN molde se lleva a cabo en condiciones de extensión de cebador. La expresión “condiciones de

extensión de cebador" hace referencia a las condiciones en que puede tener lugar la síntesis dependiente de ADN molde iniciada en un cebador.

5 La síntesis de un ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

10 Por "condiciones isotérmicas" se entiende temperatura esencialmente constante. Preferiblemente, la síntesis del ADN molde según el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención tiene lugar a una temperatura esencialmente constante. Más preferiblemente, a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 40 °C, y aún más preferiblemente, de aproximadamente 30°C.

15 Son conocidos en el estado de la técnica un amplio número de métodos que permiten la amplificación de ADN. Algunos métodos requieren un proceso de ciclado térmico como, por ejemplo, pero sin limitarse, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros métodos no requieren un proceso de ciclado térmico, sino que se realizan a una temperatura esencialmente constante como, por ejemplo, pero sin limitarse, la amplificación por círculo rodante
20 (RCA), la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación mediante lazo (LAMP). La amplificación de un ADN molde según el método de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura
25 esencialmente constante.

Preferiblemente, la amplificación del ADN molde según el método de amplificación de la presente invención tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), mediante amplificación de desplazamiento múltiple
30 (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende elementos apropiados para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención que comprende:

- 10 a) una ADN polimerasa del tipo ϕ 29,
b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
c) una sal de amonio,
d) un tampón, y
e) cloruro magnésico.

- 15 Preferiblemente, dicha sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

- 20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además una sal de potasio. Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

- En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además un cebador. En una realización más preferida, el cebador es un cebador arbitrario que está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

- 25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además nucleósidos trifosfato. Por ejemplo, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además desoxinucleósidos trifosfato y/o un didesoxinucleósido trifosfato.

- 30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador marcado. El nucleósido

marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el efecto del Tween® 20 y del (NH₄)₂SO₄ en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de ϕ 29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb). Después de incubar a 30°C durante 5 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. A la izquierda, los fragmentos de ADN lineales obtenidos después de digestión del ADN de ϕ 29 con *Hind*III, usados como marcadores de longitud del ADN.

Figura 2. Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN plasmídico (en el orden de femtogramos) por la ADN polimerasa de ϕ 29 en presencia de Tween® 20 y (NH₄)₂SO₄. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween® 20 al 0,025% y de (NH₄)₂SO₄ 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 3. Muestra el efecto del ión NH_4^+ en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween[®] 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada así como de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb).

5 Después de incubar a 30°C durante 6 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

Figura 4. Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN genómico de *Bacillus subtilis* por la ADN polimerasa de $\phi 29$ en presencia de Tween[®] 20 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween[®] 20 al 0,025% y de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

15 **Figura 5.** Muestra la notable mejora que representa el añadir Tween[®] 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al actual tampón de reacción de un kit comercial para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de $\phi 29$ (Ilustra kit de General Electrics HealthCare). El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los
20 usados en la Figura 1.

EJEMPLOS. Optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación de ADN con cebado múltiple por la ADN polimerasa de $\phi 29$.

25

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto,
30 los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

- Se ha mostrado que la ADN polimerasa de $\phi 29$ realiza una amplificación de 10^4 - 10^6 veces partiendo de varios picogramos de ADN circular. Para este fin se empleó un tampón de reacción que contiene Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, KCl 50 mM y $MgCl_2$ 10 mM (en lo sucesivo Tampón A). Después de probar la
- 5 influencia de diferentes condiciones de detergentes y sales en la capacidad de amplificación de ADN de la ADN polimerasa de $\phi 29$, encontramos que la adición simultánea de Tween[®] 20 al 0,025% y $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM al Tampón A mejora mucho la amplificación de cantidades limitadas de ADN aportado.
- 10 *Condiciones de la reacción de amplificación de ADN plasmídico.- La mezcla de incubación contenía en 12,5 μ l de tampón A, 50 μ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500 μ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP), las cantidades indicadas de un ADN plasmídico (con un tamaño de 4,2 kbp) y, donde se*
- 15 *indica, se adicionó $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM o Tween[®] 20 al 0,025% o una combinación de ambos. La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95 °C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de $\phi 29$ 50 nM y se detuvo después de la incubación a 30 °C mediante calentamiento a 65 °C*
- 20 *durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 μ l de las reacciones, se digirió el ADN amplificado con la endonucleasa de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.*
- 25 *Condiciones de la reacción de amplificación de ADN genómico.- La mezcla de incubación contenía en 12,5 μ l de tampón A, $(NH_4)_2SO_4$ 45 mM, Tween[®] 20 al 0,025%, 50 μ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500 μ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP) y las cantidades indicadas de ADN genómico de *Bacillus subtilis**
- 30 *(con un tamaño de 4 Mpb). La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95 °C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de $\phi 29$ 50 nM y se*

detuvo después de la incubación a 30 °C mediante calentamiento a 65 °C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 µl de las reacciones y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.

5

La Figura 1 muestra el efecto de añadir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM y Tween® 20 al 0,025% en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico aportado. Como se muestra, la ADN polimerasa de $\phi 29$ no dio ningún producto de amplificación detectable con el Tampón A estándar cuando se usaron 100 fg de ADN aportado. En estas condiciones de reacción, la adición de Tween® 20 al 0,025% en ausencia de ADN causó la aparición de productos de ADN en forma de rastro, lo más probable como una consecuencia de la amplificación inespecífica de ADN causada por la hibridación y elongación de los cebadores hexámeros aleatorios. Se observó el mismo rastro con 10 fg de ADN aportado. Sin embargo, en presencia de 100 fg de ADN aportado, la adición de Tween® 20 al 0,025% permitió que la ADN polimerasa de $\phi 29$ produjera una cantidad detectable de plásmido amplificado. La producción total de ADN amplificado, específico o inespecífico, indica que la adición de Tween® 20 al 0,025% al Tampón A potencia la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$. Se observó un efecto similar con el detergente NP40. Por el contrario, otros detergentes analizados como Triton X100 y Triton X114 no potenciaban la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$ (no se muestra). La adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al tampón A tenía dos consecuencias en el rendimiento y la especificidad de los productos amplificados: 1) no se detectó amplificación de ADN en ausencia de ADN aportado; 2) se obtuvieron por amplificación varios µg de ADN plasmídico de unidad longitud, incluso cuando la cantidad de ADN aportado era tan baja como 10 fg. Como control, la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al Tampón A no produjo ninguna mejora en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de $\phi 29$.

30

Por lo tanto, podemos concluir que la adición simultánea de Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al Tampón A (en lo sucesivo Tampón B) produce

- una clara optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación con cebado múltiple de ADN circular por la ADN polimerasa de $\phi 29$, siendo ambos reactivos absolutamente necesarios para amplificar cantidades limitadas (10 fg) de ADN aportado. De hecho, como puede verse en la Figura 2, el uso de Tampón B permitió a la ADN polimerasa de $\phi 29$ sintetizar microgramos de ADN usando una cantidad de plásmido aportado tan baja como 0,1 fg (~24 moléculas) después de 6 horas de reacción. Como control de calidad, la digestión de los productos de amplificación con *EcoRI* generó fragmentos de ADNbc lineales de 4,2 kb, que indicaban que el producto de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original. De nuevo, el Tampón B también evitó la amplificación de ADN inespecífico (véase en la Figura 2 las calles correspondientes a las reacciones llevadas a cabo sin ADN aportado).
- La Figura 3 muestra el efecto de los iones amonio y Tween® 20 al 0,025% en la mejora en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones anteriormente comentadas en presencia Tween® 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada. Como se puede observar en la Figura 3 tanto el NH_4Cl como el $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ tuvieron un efecto similar al $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tanto en el rendimiento como en la especificidad de los productos amplificados. Este resultado indica que el efecto anteriormente descrito del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la amplificación de cantidades limitantes de ADN plasmídico es debido a los iones NH_4^+ .
- Para determinar si las condiciones optimizadas descritas antes también se aplicaban a la amplificación de ADN genómico, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos realizados en presencia de concentraciones limitadas de ADN genómico de *B. subtilis* (4 Mpb de longitud). Como se muestra en la Figura 4, la presencia de Tween® 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM en el tampón B, por una parte evitaba la amplificación inespecífica de ADN (calles sin ADN aportado), y por otra parte, permitía a la ADN polimerasa de $\phi 29$ dar amplificación detectable y específica del ADN genómico incluso cuando se

usaban 10 fg de ADN aportado, es decir, una cantidad 10^6 veces inferior a la recomendada en los actuales kits de amplificación genómica comerciales.

Para determinar si la adición simultánea de Tween[®] 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM incrementa la eficiencia de amplificación de los actuales kits comerciales para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de ø29, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos de amplificación de ADN plasmídico descrito en las Figuras 1, 2 y 3. En la Figura 5 se muestra la notable mejora que representa el añadir Tween[®] 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al actual tampón de reacción del kit Illustra (GE HealthCare). Como se puede observar, siguiendo las recomendaciones del proveedor, con el kit Illustra sólo se puede amplificar de manera detectable en gel de agarosa cantidades de plásmido aportado iguales o superiores a 10 pg. Por el contrario, la adición simultánea de Tween[®] 20 al 0,025% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM al tampón de reacción del kit Illustra disminuye de manera notable la cantidad necesaria de ADN que puede amplificarse, observándose productos de amplificación desde 1 fg aportado de ADN plasmídico, suponiendo una mejora de cuatro órdenes de magnitud en la amplificación.

REIVINDICACIONES

1. Método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que
5 comprende, al menos:
- a) una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$,
 - b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
 - c) una sal de amonio,
 - 10 d) un tampón,
 - e) cloruro magnésico,
 - f) un cebador, y
 - g) nucleósidos trifosfato.
- 15 2. Método según la reivindicación 1 donde la mezcla de reacción además comprende una sal de potasio.
3. Método según la reivindicación 2 donde la sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción.
- 25 5. Método según la reivindicación 4 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción.
- 30 6. Método según la reivindicación 5 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.
- 5 8. Método según la reivindicación 7 donde la sal de amonio es sulfato de amonio.
9. Método según la reivindicación 8 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM.
- 10 10. Método según la reivindicación 9 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM.
11. Método según la reivindicación 7 donde la sal de amonio es cloruro de amonio o acetato de amonio.
- 15 12. Método según la reivindicación 11 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM.
- 20 13. Método según la reivindicación 12 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos: ϕ 29, Cp-1, PRD-1, ϕ 15, ϕ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o ABV.
- 25 15. Método según la reivindicación 14 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1.
- 30

16. Método según la reivindicación 15 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1.
- 5 17. Método según la reivindicación 16 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 10 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 presenta una modificación en el dominio exonucleasa y donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
- 15 19. Método según la reivindicación 18 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 modificada tiene menos del 1 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
- 20 20. Método según la reivindicación 19 donde la ADN polimerasa del tipo ϕ 29 modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 donde el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES.
- 25 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 donde el tampón está a un pH de entre 7 y 8,5.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM.
- 30 24. Método según la reivindicación 23 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 24 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM.
- 5 26. Método según la reivindicación 25 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM.
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 donde los nucleósidos trifosfato son dCTP, dGTP, dTTP y dATP.
- 10 28. Método según la reivindicación 27 donde los nucleósidos trifosfato dCTP, dGTP, dTTP y dATP se encuentran en cantidades equimolares.
29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 donde el cebador es arbitrario y está protegido contra la acción de exonucleasas.
- 15 30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 donde el ADN molde es ADN plasmídico.
31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 donde el ADN molde es ADN genómico.
- 20 32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 donde la amplificación se realiza a una temperatura esencialmente constante entre 25 y 40 °C.
- 25 33. Método de amplificación de un ADN molde según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 donde la amplificación tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).
- 30

26

34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

5 35. Kit para llevar a cabo un método según las reivindicaciones 1 a 34 que comprende:

- a) una ADN polimerasa del tipo $\phi 29$,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
- c) una sal de amonio,
- 10 d) un tampón, y
- e) cloruro magnésico.

36. Kit según la reivindicación 35 que además comprende una sal de potasio.

15

37. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 ó 36 que además comprende un cebador.

20 38. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 que además comprende el cebador según la reivindicación 29.

39. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38 que además comprende nucleósidos trifosfato.

25 40. Kit según las reivindicaciones 37 a 39 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

RESUMEN

La presente invención se encuadra dentro del campo de la Biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido nucleico con una ADN polimerasa del tipo Taq, que comprende incubar dicha polimerasa en una mezcla de reacción que comprenda monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20) a una concentración del 0,003-0,01%, junto con una sal amonio, ya sea sulfato de amonio 30-60 mM, ya cloruro de amonio o acetato de amonio 60-120mM, entre otros componentes. Tan bien se incluye un kit para llevar a cabo dicho método.

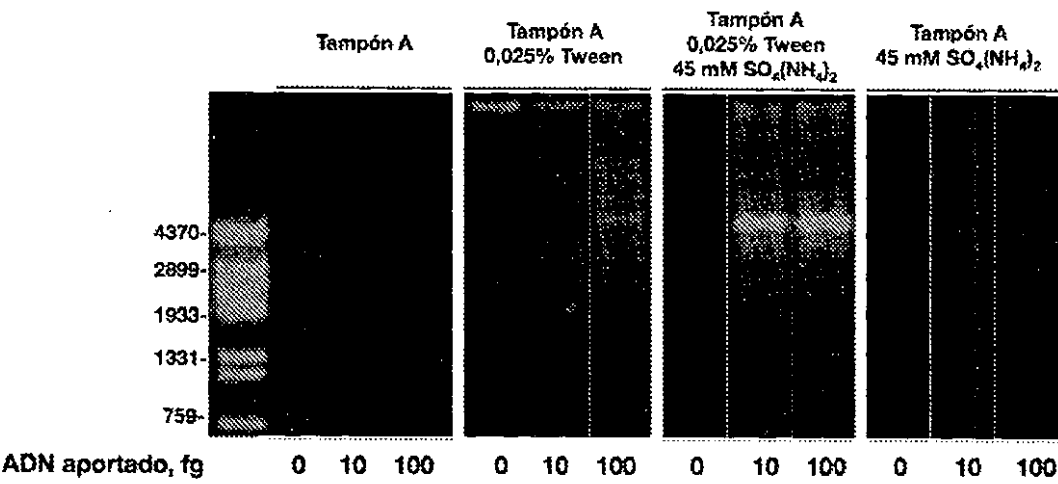


FIG. 1

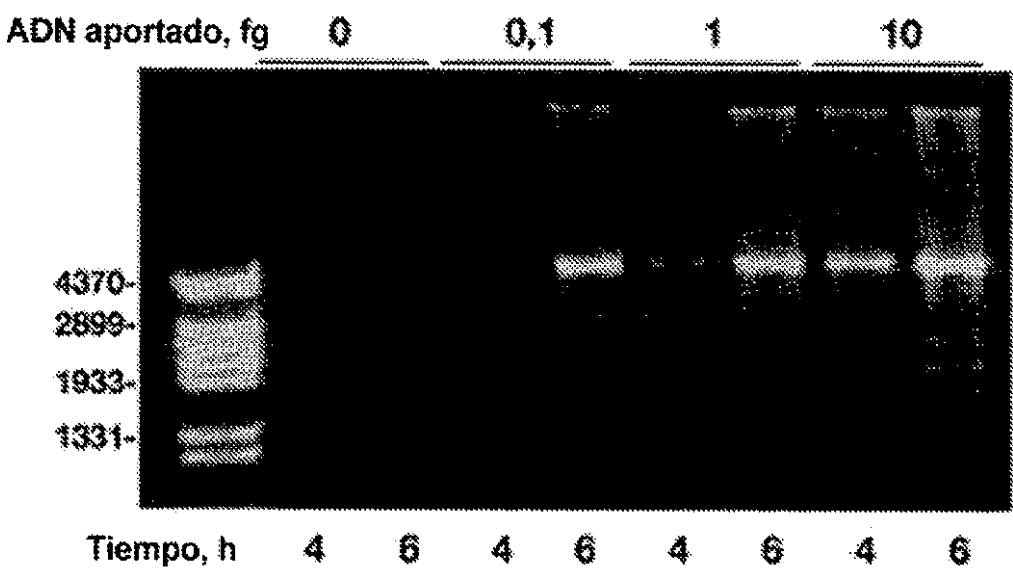


FIG. 2

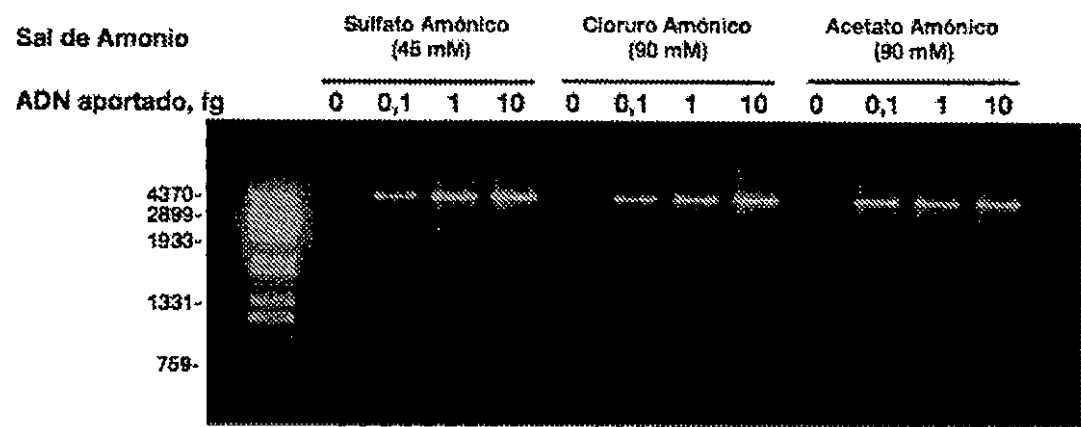


FIG. 3

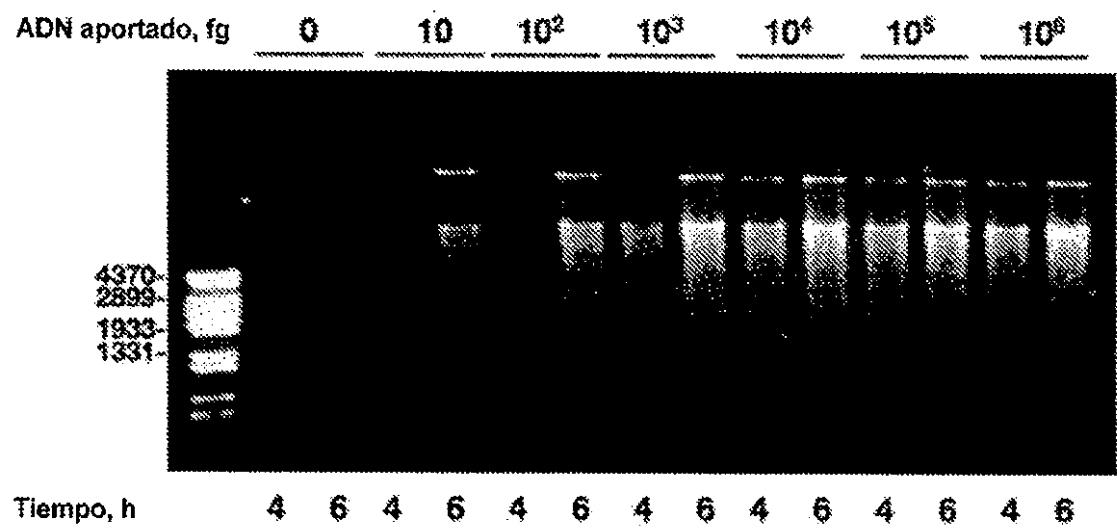


FIG. 4

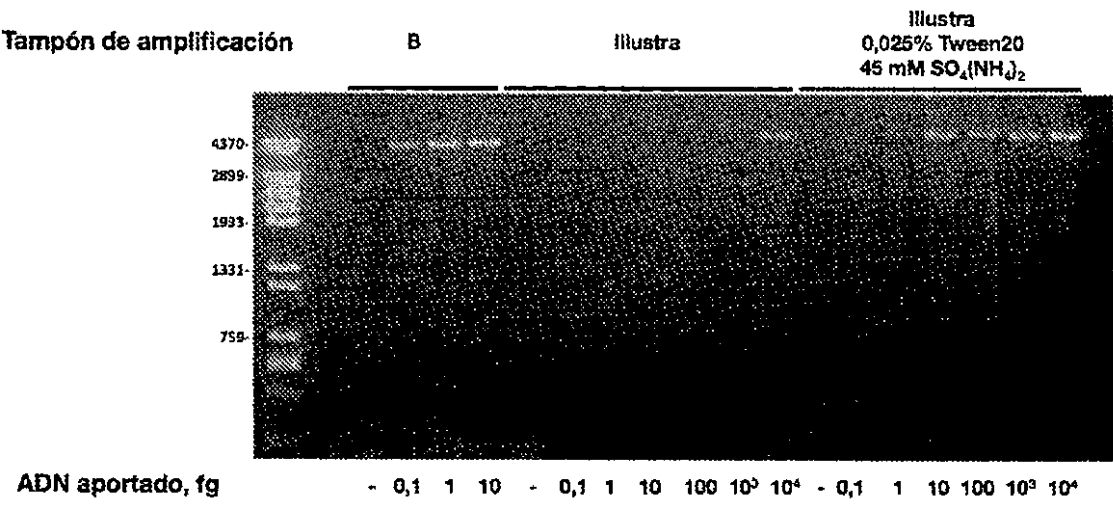


FIG. 5

Metodo amplificacion de ADN polimerasa del fago phi29_ST25
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
<120> Método para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.
<130> ES1641.386.2
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 572
<212> PRT
<213> Bacteriophage phi-29
<400> 1

Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Asp Phe Glu Thr Thr Thr Lys Val
1 5 10 15

Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile Glu Asp His
20 25 30

Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met Ala Trp Val
35 40 45

Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys Phe Asp Gly
50 55 60

Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys Trp Ser Ala
65 70 75 80

Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg Met Gly Gln
85 90 95

Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys Arg Lys Ile
100 105 110

His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe Pro Val Lys
115 120 125

Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly Asp Ile Asp
130 135 140

Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro Glu Glu Tyr
145 150 155 160

Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Arg Leu Leu Ile
165 170 175

Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser Asp Ser Leu
180 185 190

Metodo amplificacion de ADN polimerasa del fago phi29_ST25
 Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys Lys Val Phe
 195 200 205

Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr Ala Tyr Arg
 210 215 220

Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys Glu Ile Gly
 225 230 235 240

Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala Gln Met Tyr
 245 250 255

Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu Gly Lys Tyr
 260 265 270

Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile Arg Cys Glu
 275 280 285

Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile Lys Arg Ser
 290 295 300

Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Gly Glu Ile
 305 310 315 320

Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met Lys Glu His
 325 330 335

Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys Phe Lys Ala
 340 345 350

Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr Tyr Ile Lys
 355 360 365

Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu Met Leu Asn
 370 375 380

Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr Gly Lys Val
 385 390 395 400

Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu Gly Glu Glu
 405 410 415

Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe Ile Thr Ala
 420 425 430

Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Arg
 435 440 445

Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly Thr Glu Ile
 450 455 460

Metodo amplificacion de ADN polimerasa del fago phi29_ST25
Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Trp
465 470 475 480

Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Val Lys Tyr Leu Arg Gln Lys Thr
485 490 495

Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys Leu Val Glu
500 505 510

Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val Lys Cys Ala
515 520 525

Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu Asn Phe Lys
530 535 540

Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln Val Pro Gly
545 550 555 560

Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys
565 570

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2010/070456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHOAIB, M., BACONNAIS, S., MECHOLD, U. et al. Multiple displacement amplification for complex mixtures of DNA fragments. BMC Genomics. September 2008, Vol. 9, N° 1, pages 415-429. ISSN 1471-2164. Especially discussion, conclusion and methods.	1-3, 7, 8, 11, 14-40
Y		4-6
A		9, 10, 12, 13
Y	HART, M. C., GREEN, D. H., BRESNAN, E., BOLCH, C. J. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of <i>Dinophysis</i> (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. Harmful Algae. January 2007, Vol. 6, N° 2, pages 271-287. ISSN 1568-9883. <Doi:10.1016/j.hal.2006.10.001> Especially paragraph 2.2.	4-6
A		1, 7-13, 21-24, 27-31, 34, 35, 37-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10/11/2010

Date of mailing of the international search report
(26-11-2010)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
E. Relaño Reyes

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2010/070456

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLANCO, L., PRIETO, I., GUTIÉRREZ, J. et al. Effect of NH ₄ ⁺ ions on ϕ29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. Journal of Virology. December 1987, Vol. 61, Nº 12, pages 3983-3991. ISSN 0022-538X.	1-3, 7-17, 21-40
A	WO 2001/025483 A2 (STRATAGENE) 12.04.2001 pages 16 - 19; example 3.	1-13, 21-31, 34-40
A	US 5198543 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 30.03.1993 the whole document.	1, 7-24, 27-35, 37-40
A	BLASCO, M. A., BLANCO, L., PARÉS, E., et al. Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage ϕ29 DNA polymerase. Nucleic Acids Research. August 1990, Vol. 18, Nº 16, pages 4763-4770. ISSN 0305-1048. & UniProt Database. Accession Number Q38545, Version 44. [on line] 16.12.2008 [Retrieved the 19.10.2010] Retrieved from the Internet: <URL:http://www.ebi.ac.uk/uniprot/unisave/?help=0&session=/ebi/extserv/old-work/SESSION23172-1287478337-1&index=8&view=623246632&issue_date=16-DEC-2008>	1, 14-17, 21-24, 27-32, 34, 35, 37-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2010/070456

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2001/025483 A2	12.04.2001	AU6239600 A EP1218500 A1 US2003049614 A1 JP2003511044 T US2004072213 A1 US2006246462 A1	10.05.2001 03.07.2002 13.03.2003 25.03.2003 15.04.2004 02.11.2006
US5198453 A	30.03.1993	CA2092234 A FI931275 A FI107446B B EP0562739 A,B JP7265866 A JP2918760B2 B ES2083822 T DE69301116 T KR100264499B B	25.09.1993 25.09.1993 15.08.2001 29.09.1993 17.10.1995 12.07.1999 16.04.1996 04.07.1996 01.09.2000

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2010/070456

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
C12Q1/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	SHOAIB, M., BACONNAIS, S., MECHOLD, U. et al. Multiple displacement amplification for complex mixtures of DNA fragments. BMC Genomics. Septiembre 2008, Vol. 9, Nº 1, páginas 415-429. ISSN 1471-2164. En especial discusión, conclusiones y métodos.	1-3, 7, 8, 11, 14-40
Y		4-6
A		9, 10, 12, 13
Y	HART, M. C., GREEN, D. H., BRESNAN, E., BOLCH, C. J. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of <i>Dinophysis</i> (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. Harmful Algae. Enero 2007, Vol. 6, Nº 2, páginas 271-287. ISSN 1568-9883. <Doi:10.1016/j.hal.2006.10.001> En especial apartado 2.2.	4-6
A		1, 7-13, 21-24, 27-31, 34, 35, 37-40

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 10/11/2010	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional. 26 de noviembre de 2010 (26-11-2010)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2010/070456

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BLANCO, L., PRIETO, I., GUTIÉRREZ, J. et al. Effect of NH4 ⁺ ions on ϕ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. Journal of Virology. Diciembre 1987, Vol. 61, Nº 12, páginas 3983-3991. ISSN 0022-538X.	1-3, 7-17, 21-40
A	WO 2001/025483 A2 (STRATAGENE) 12.04.2001 páginas 16 - 19; ejemplo 3.	1-13, 21-31, 34-40
A	US 5198543 A (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 30.03.1993 todo el documento.	1, 7-24, 27-35, 37-40
A	BLASCO, M. A., BLANCO, L., PARÉS, E., et al. Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage ϕ 29 DNA polymerase. Nucleic Acids Research. Agosto 1990, Vol. 18, Nº 16, páginas 4763-4770. ISSN 0305-1048. & Base de datos UniProt. Número de acceso Q38545, Versión 44. [en línea] 16.12.2008 [recuperado el 19.10.2010] Recuperado de Internet: <URL:http://www.ebi.ac.uk/uniprot/unisave/?help=0&session=/ebi/extserv/old-work/SESSION23172-1287478337-1&index=8&view=623246632&issue_date=16-DEC-2008>	1, 14-17, 21-24, 27-32, 34, 35, 37-40

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2010/070456

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2001/025483 A2	12.04.2001	AU6239600 A	10.05.2001
		EP1218500 A1	03.07.2002
		US2003049614 A1	13.03.2003
		JP2003511044 T	25.03.2003
		US2004072213 A1	15.04.2004
		US2006246462 A1	02.11.2006
US5198453 A	30.03.1993	CA2092234 A	25.09.1993
		FI931275 A	25.09.1993
		FI107446B B	15.08.2001
		EP0562739 A,B	29.09.1993
		JP7265866 A	17.10.1995
		JP2918760B2 B	12.07.1999
		ES2083822 T	16.04.1996
		DE69301116 T	04.07.1996
		KR100264499B B	01.09.2000

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12Q 001/068	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)	
(30) Prioridad	(31) Prioridad P 200930412	(32) Fecha 02/07/2009	(33) País ES
		(72) Inventor(es) MARGARITA SALAS FALGUERAS Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 02/02/2012		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 06/01/2011
	Fecha de presentación de la solicitud: 02/07/2010		N° publicación: WO 2011/000998 A3
	No. de solicitud PCT/ES2010/070456		
(54) Titulo: METODO PARA LA REPLICACIÓN, AMPLIFICACIÓN O SECUENCIACIÓN DE UN ADN MOLDE			

Resumen:

La presente invención se encuadra dentro del campo de la Biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido ácido con un ADN polimeresa del tipo o29, que comprende incubar dicha polimeresa en una mezcla de reaccion que comprenda monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20) a una concentración del 0,003-0,01%, junto con una sal amonio, ya sea sulfato de amonio 30-60 mM, ya cloruro de amonio o acetato de amonio 60-120mM, entre otros componentes. Tan bien se incluye un kit para llevar a cabo dicho método.

47 46

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 125060

Bogotá D.C., Diciembre 23 de 2011 - 14:04:17

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470901	23/12/2011	12.939.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00	5.000.00
				\$5.000.00

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180680- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 52

COLO: 19036 - 841-002-2.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-810165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 23 de 2011 - 14:04:34

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 125061
		Bogotá D.C., Diciembre 23 de 2011 - 14:04:17

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470901	23/12/2011	12.939.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00 5.000.00
			===== \$5.000.00 =====

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180680- -00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 52

COLOI19036-841-002-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122613
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL	289.000.00	289.000.00
			\$289.000.00

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180680- 00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 52

Colo: 19036 - 841-002-2.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

. Diciembre 16 de 2011 - 18:38:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 123935
		Bogotá D.C., Diciembre 21 de 2011 - 10:56:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470890	21/12/2011	9.271.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	114 PTC CAP-III EXAMEN DE PATENTIBILIDAD DE INVENSIÓN	485.000.00	485.000.00
			<u>\$485.000.00</u>

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Gaja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180680-00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/II Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 52

0020: 19036 - 841-002-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 125036

Bogotá D.C., Diciembre 23 de 2011 - 14:04:17

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470901	23/12/2011	12.939.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180680-00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 52

COTO: 14036-841-002-2

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Consultador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 23 de 2011 - 14:04:33



No. 11-180680- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:44:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 52

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT. ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐