



19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 103 741**

51 Int. Cl.⁶: C12P 19/34

C12Q 1/68

C12N 9/12

C07H 15/12

C07H 17/00

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **90908867.6**

86 Fecha de presentación : **13.04.90**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 527 728**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.93**

54 Título: **Reacciones de síntesis de DNA (in vitro) que emplean DNA polimerasa de phi 29 modificada y un fragmento de DNA que codifica dicha polimerasa.**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.10.97

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.10.97

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
E-28006 Madrid, ES
United States Biochemical Corporation**

72 Inventor/es: **Blanco, Luís;
Bernad, Antonio y
Salas, Margarita**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Este invento se refiere al uso de DNA polimerasas del tipo $\phi 29$ modificadas, en particular DNA polimerasas del tipo $\phi 29$ modificadas para que tengan poca o ninguna actividad de exonucleasa.

Por DNA polimerasa del tipo $\phi 29$ se entiende cualquier DNA polimerasa aislada de células infectadas con fagos del tipo $\phi 29$, que empleen una proteína terminal para la iniciación de la replicación del DNA. Estos fagos están descritos de forma general por *Salas., 1 en The Bacteriophages 169, 1988*. Estos fagos están muy relacionados en la estructura de sus DNA polimerasas, difiriendo tan poco como en 6 cambios de aminoácidos, estando 5 de estos aminoácidos reemplazados por aminoácidos similares. Estos fagos tienen una corta secuencia de repetición terminal invertida de una longitud comprendida entre aproximadamente 6 y 300 nucleótidos. Estas polimerasas tienen una actividad exonucleasa 3'-5' muy activa, pero carecen de actividad exonucleasa 5'-3'. Sorprendentemente, aunque están relacionadas con las DNA polimerasas de la familia T4, son capaces de reconocer adecuadamente agentes terminadores de cadenas, tales como dideoxinucleósidos y por consiguiente son útiles para secuenciar DNA. Esta capacidad es incluso más sorprendente ya que se sabe que la exonucleasa reconoce tanto desoxi-AMP como dideoxi-AMP. *Blanco et al, 13 Nuc. Acid. Res. 1239, 1246, 1985*.

Como ejemplo, las DNA polimerasas de tipo $\phi 29$ adecuadas para dar por modificación una DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ mutante, para los fines de los métodos descritos en la presente memoria, incluyen $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, SF5, GA-1, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722 y L17. Una DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ mutante para los fines de la presente invención es una polimerasa modificada que tiene menos de 10% de la actividad exonucleasa de la polimerasa de origen natural. Preferiblemente, la polimerasa modificada tiene menos de 1%, e incluso más preferiblemente carece sustancialmente de actividad exonucleasa comparada con la polimerasa correspondiente natural, es decir la no modificada.

Por "correspondiente" se quiere decir que la polimerasa modificada se deriva de una polimerasa natural, generalmente por mutagénesis *in vitro* de la secuencia de DNA que codifica esta última polimerasa, y esta última es la polimerasa correspondiente.

Para este fin, un fragmento de DNA que codifica una polimerasa natural apropiada puede modificarse para eliminar sustancialmente, de ese producto de expresión, la actividad exonucleasa que existe de forma natural. Pueden emplearse las secuencias de DNA que codifican una DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ en la que el residuo de aminoácido en la posición 12, 14 o 16 de la polimerasa está reemplazado por un residuo de alanina.

En un aspecto, el presente invento proporciona por tanto un método para la amplificación de una secuencia de DNA que incluye las etapas

de asociar un primer cebador y un segundo cebador a cadenas opuestas de una secuencia de DNA bicatenario e incubar la mezcla asociada con una DNA polimerasa, en el que la DNA polimerasa empleada es una DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada que presenta menos de 10% de la actividad exonucleasa de la polimerasa natural correspondiente.

En realizaciones preferidas, los cebadores primero y segundo tienen sus extremos 3' dirigidos uno hacia el otro después de la asociación; el método incluye además, después de la etapa de incubación, desnaturalizar el DNA resultante, asociar el primer y el segundo cebadores al DNA desnaturalizado e incubar la última mezcla asociada con la polimerasa; repitiéndose el ciclo de desnaturalización, asociación e incubación de 10 a 40 veces.

En otro aspecto, el invento proporciona un método para la producción de moléculas de DNA de una longitud superior a 10 kilobases. El método incluye proporcionar una molécula de DNA molde; asociar un cebador a la molécula molde; e incubar las moléculas de cebador y molde asociadas en presencia de una DNA polimerasa del tipo $\phi 29$ modificada como se ha descrito anteriormente y una mezcla de los cuatro diferentes trifosfatos de desoxinucleósidos.

La alta procesividad retenida por una DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada como la descrita en lo que antecede significa que el método de amplificación de la presente invención es adecuado para amplificar fragmentos de DNA muy grandes (de una longitud superior a 10 kilobases). Dicho método de amplificación puede ser un procedimiento del tipo de la reacción en cadena de la polimerasa (abreviadamente PCR correspondiente a sus iniciales en inglés). Estos largos tramos de DNA se emplean en trabajo forense cuando se dispone sólo de pequeñas muestras de DNA, y para análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (en lo sucesivo RFLP por sus iniciales en inglés).

Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción de sus realizaciones preferidas, y de las reivindicaciones.

Descripción de las realizaciones preferidas
Primeramente se describirán brevemente los dibujos.

Dibujos

La Figura es una representación de la secuencia de aminoácidos de diversas DNA polimerasas que muestran sitios de homología entre las polimerasas. ExoI, ExoII, y ExoIII se refieren a las tres regiones de homología de aminoácidos encontradas entre las diferentes DNA polimerasas comparadas en la Figura. Las estrellas indican los residuos de DNA polimerasa I de *E. coli* implicados bien sea en la fijación de metales o bien sea en catálisis exonucleolítica. Los asteriscos indican los residuos de DNA polimerasa I de *E. coli* implicados en la fijación de DNA monocatenario. Los recuadros marcados por líneas o flechas, y provistos de letras o cifras, son regiones de hélices α y láminas β respectivamente de DNA polimerasa I.

DNA polimerasa
Una DNA polimerasa modificada para empleo en el método del invento es procesiva y tiene poca

o ninguna actividad exonucleasa asociada (menos del 10% de la actividad exonucleasa exhibida por la polimerasa natural correspondiente). Estas polimerasas también tienen actividad de desplazamiento de cadena.

Con el término "procesiva" se quiere decir que la DNA polimerasa es capaz de incorporar continuamente nucleótidos empleando el mismo molde cebador, sin disociarse tanto de las moléculas del cebador como del molde, en las condiciones normalmente empleadas para reacciones de prolongación de secuencias de DNA, u otras reacciones de prolongación con cebador. Generalmente, una polimerasa para empleo en un método de la presente invención permanecerá unida al cebador o molde prolongado para al menos 1-2 kilobases, generalmente al menos 5kb-10kb, en condiciones ambientales adecuadas.

La capacidad de las polimerasas de producir desplazamiento de cadena es una ventaja porque, en combinación con la alta procesividad, permite la síntesis de grandes moléculas de DNA de al menos 70 kb, o incluso mayores. La actividad de desplazamiento de cadena se mide por cualquier técnica estándar, por ejemplo puede incubarse una polimerasa en una mezcla con una molécula de DNA circular monocatenario (por ejemplo M13) y un cebador. Si se sintetizan moléculas de DNA de mayor longitud que la molécula circular original, entonces la polimerasa es capaz de desplazar las cadenas de DNA de una molécula bicatenaria y continuar sintetizando DNA. Por tanto, tiene actividad de desplazamiento de cadena. Dicha actividad está presente por lo general en una sola molécula proteínica, por ejemplo, p2 de $\phi 29$, y no requiere energía en forma de ATP o su equivalente, empleando solo los trifosfatos de dideoxinucleósidos usuales requeridos para sintetizar DNA. Esta actividad también se observa cuando la síntesis de DNA es iniciada por una proteína terminal, por ejemplo p3 de $\phi 29$.

Se prefiere que el nivel de actividad de exonucleasa se reduzca a un valor que sea menor que 1%, preferiblemente menor que 0,1%, de la actividad normalmente asociada a las DNA polimerasas aisladas de células infectadas con bacteriófagos que existen en la naturaleza. La modificación de una DNA polimerasa para la finalidad del presente invento puede realizarse por medios genéticos o químicos.

Los ejemplos siguientes explican el invento con referencia a la DNA polimerasa de $\phi 29$. Los ejemplos no han de interpretarse como limitativos del invento. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de las DNA polimerasas enumeradas anteriormente pueden emplearse similarmente del modo descrito a continuación.

DNA polimerasa de $\phi 29$

El bacteriófago $\phi 29$ es una molécula de DNA lineal y bicatenaria que tiene una proteína de 31kD unida covalentemente en el extremo 5'. Esta proteína terminal, denominada p3, es el producto del gen viral 3, y está unida al DNA por un enlace fosfoéster entre el grupo OH del residuo de serina y 5'-dAMP. La replicación de $\phi 29$ se inicia en cualquier extremo del DNA mediante un mecanismo de cebado con proteína en el que la molécula libre de la proteína terminal p3 reac-

ciona con dATP para formar un complejo covalente proteína p3-dAMP que proporciona el grupo 3'-OH necesario para la elongación. La reacción de iniciación requiere, además del producto del gen 3 y del molde de DNA de $\phi 29$ -proteína p3, el producto del gen viral 2 (p2), que es la DNA polimerasa. La proteína p2 producida por el gen 2 tiene un peso molecular de 66,5kD. Asociada con la proteína p2 está una actividad de exonucleasa 3'-5' activa en DNA monocatenario y en cierto grado en DNA bicatenario. La proteína p2 puede purificarse por un procedimiento estándar a partir de células de *E. coli* que albergan un plásmido recombinante que contiene el gen 2, como se ha descrito por Blanco *et al.*, 29 *Gene* 33, 1984. La proteína puede purificarse también por paso por una columna de fosfocelulosa, como se ha descrito por Blanco *et al.* 13 *Nucl. Acids Res.* 1239, 1985. Blanco *et al.*, id. también describieron un ensayo de exonucleasa adecuado para la determinación de la inactivación de la actividad exonucleasa por manipulación genética como se describe a continuación. Otras enzimas asociadas a p2 y p3 en el bacteriófago $\phi 29$ incluyen p5 y p6, que incrementan la eficacia de polimerización por p2, como ha sido descrito por Salas, 109 *Current Topics in Microbiology and Immunology* 89, 1983.

Mutantes de exonucleasa

Vamos a describir ahora brevemente la clonación de DNA polimerasa de $\phi 29$ y la manipulación del gen de la p2 para producir ejemplos de mutantes de exonucleasas útiles en esta invención.

El plásmido de partida fue pBw2, que es un derivado de pBR322 que contiene el gen 2 del fago $\phi 29$, que codifica la DNA polimerasa de $\phi 29$, e incluye su secuencia de fijación al ribosoma (RBS) (Blanco *et al.*, 29, *Gene*, 33, 1984). En esta construcción el supuesto codón ATG de iniciación para la DNA polimerasa de $\phi 29$ está localizado 30 pb después de un sitio de restricción único Hind III. El plásmido pBw2 se linealizó con Hind III y se sometió a una digestión controlada con la nucleasa Bal31. El DNA se digirió con la nucleasa de restricción ScaI, que corta 444 pares de bases más abajo del gen 2 y los extremos sobresalientes 5' se rellenaron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. El fragmento de DNA que contenía el gen 2 se ligó con la DNA-ligasa de T4 al plásmido pAZe3ss (Zaballos *et al.*, 58 *Gene* 67, 1987) y se digirió con NcoI, cuyos extremos sobresalientes 5' se rellenaron a continuación empleando el fragmento Klenow. El producto de ligación se empleó para transformar células M72 de *E. coli* competentes (lisogénicas para el bacteriófago λ y que contienen el represor ci857 sensible a la temperatura) y se seleccionaron las bacterias resistentes a la ampicilina. Estas últimas se replicaron en placas que contenían ampicilina (100 μ /ml) dejándolas crecer durante una noche a 30°C, seguidas por 3 h a 42°C. Las colonias se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se lisaron con dodecil-sulfato sódico al 0,1%. Los filtros se lavaron, se incubaron con suero de conejo anti-DNA polimerasa de $\phi 29$ (producido por un método estándar) y las colonias que contenían DNA polimerasa de $\phi 29$ se detectaron por incubación con [¹²⁵I]-proteína A seguido por autorradiografía. La secuenciación del DNA de los

clones seleccionados permitió la selección de los plásmidos recombinantes pAZw200 y pAZa203, que incluyen el DNA de $\phi 29$ a partir de los tripletes ATG que corresponden a las posiciones 2869-2867 y 2860-2858, respectivamente, en el marco de lectura abierta que codifica p2, desde el extremo izquierdo del DNA de $\phi 29$ (Yoshikawa et al. 17, *Gene*, 323, 1983). Cuando las células de *E. coli* M72, transformadas con los plásmidos recombinantes pAZw200 o pAZa203, que contenían el gen que codifica la DNA polimerasa de $\phi 29$ bajo el control del promotor P_L del bacteriófago λ y con el RBS del gen *ner* del bacteriófago Mu, se dejaron crecer a 30°C y luego se elevó la temperatura a 42°C durante 20 minutos para inactivar el represor λ CI857, seguido por dos horas a 38°C, se sintetizó DNA polimerasa de $\phi 29$ enzimáticamente activa. Se obtuvieron aproximadamente 150 y 300 μ g de DNA polimerasa de $\phi 29$ muy purificada por gramo de células transformadas con los plásmidos recombinantes pAZw200 y pAZa203, respectivamente.

El fragmento EcoRI-Hind III del plásmido recombinante pAZw200, que contenía el gen de la DNA polimerasa de $\phi 29$ y la RBS del gen *ner* del bacteriófago Mu se ligó, empleando DNA ligasa de T4, a los sitios EcoRI-Hind III de la forma replicativa del bacteriófago M13mp19. Las células de *E. coli* JM103 se transfectaron con dicho DNA y se seleccionaron las placas blancas en placas que contienen X-gal e isopropiltiogalactosido (IPTG). Las placas seleccionadas se amplificaron en medio líquido y se aisló la forma replicativa para comprobar (por análisis de restricción) la presencia del fragmento EcoRI-Hind III deseado. También se aisló el DNA monocatenario y se usó para mutagénesis dirigida, realizada como se ha descrito por Nakamaya et al., 14 *Nucl. Acids Res.* 9679, 1986. Los oligodesoxinucleótidos sintéticos usados para la mutagénesis puntual fueron:

- 1) 5' AGTTGTGCCTTTGAGAC
- 2) 5' GACTTTGCGACAACACTAC
- 3) 5' CTCAAATTTGCCGGAGC

Los clones recombinantes que contienen mutaciones puntuales se seleccionaron por hibridación a los correspondientes oligonucleótidos mutagénicos, marcados en 5' con 32 P, con polinucleótido quinasa de T4 y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. De los clones seleccionados se aisló DNA monocatenario y se determinó la secuencia del gen completo de la DNA polimerasa para comprobar que cada clon contenía sólo la mutación deseada. El fragmento EcoRI-BstBI de los diferentes clones se ligó con DNA ligasa de T4 a los mismos sitios del plásmido pABw2, que contiene el fragmento EcoRI-Hind III del plásmido pAZw200 clonado en los sitios correspondientes del plásmido pT7-3 de la serie pT-7 (Tabor et al. 82 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1074, 1985), bajo el control del promotor $\phi 10$ del bacteriófago T7. Este fragmento EcoRI-BstBI reemplaza a la secuencia de tipo silvestre en esa región por la secuencia mutante correspondiente. De este modo se seleccionaron los plásmidos recombinantes pABn2D12A, pABn2E14A, pABn2D66A,

pABn2D12AD66A y pABn2E14D66A, que contenían cambios de aminoácidos correspondientes desde el extremo amino terminal de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Los plásmidos recombinantes se emplearon para transformar las células de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 en el DNA huésped bajo el control del promotor lac uv5 (Studier et al., 189 *J. Mol. Biol.* 113, 1986) que es, por tanto, inducible por IPTG. Las bacterias resistentes a la ampicilina se analizaron con el fin de detectar la presencia de los plásmidos recombinantes. La expresión de las proteínas mutantes de la DNA polimerasa de $\phi 29$ se obtuvo por adición de IPTG 1mM a células de *E. coli* que contenían los plásmidos recombinantes, crecidos a 37°C e incubados durante 1 hora a 37°C. Se obtuvieron cinco proteínas mutantes diferentes, con los siguientes cambios de aminoácidos: 1) alanina en la posición 12 (con referencia a la primera metionina en el gen que codifica p2) en lugar del ácido aspártico natural (D12A); 2) alanina en la posición 14 en lugar de ácido glutámico (E14A); 3) alanina en la posición 66 en lugar de ácido aspártico (D66A); 4) alanina en las posiciones 12 y 66 en lugar de ácido aspártico (D12A, D66A); y 5) alanina en las posiciones 14 y 66 (E14A, D66A). Las diferentes proteínas mutantes se purificaron y se determinó su actividad de exonucleasa 3'-5' por el ensayo estándar anterior, siendo 100-1000 veces inferior a la de la DNA polimerasa de $\phi 29$ de tipo silvestre que se presenta en la naturaleza.

Depósitos

Las cepas pAZW200 (gen de la p2 de tipo silvestre), pKC30A1 (gen de la p3 de tipo silvestre), pABN2D12AD66A (gen de la p2 deficiente en exonucleasa que tiene alanina en las posiciones 12 y 66) se depositaron bajo las regulaciones del Tratado de Budapest el 24 de marzo de 1989, en el organismo estadounidense ATCC, siéndoles asignados los números 67920, 67918 y 67919, respectivamente.

Con referencia a la Figura de los dibujos, se seleccionaron los oligonucleótidos usados para formar los mutantes anteriores teniendo en cuenta la homología de la secuencia de aminoácidos con otras polimerasas y con las mutaciones que se sabe que reducen la actividad de exonucleasa de la DNA polimerasa de tipo I (Derbyshire et al. 240 *Science* 199, 1988). Otras mutaciones que probablemente producen mutantes adecuados de exonucleasa se muestran en los recuadros negros. Generalmente, el aminoácido en estas porciones está o bien deletado (suprimido) o reemplazado por un aminoácido diferente. En este invento también son útiles grandes deletaciones o múltiples reemplazamientos de aminoácidos. Después de la mutagénesis, se mide el nivel de la actividad exonucleasa y se determina la magnitud de la actividad de DNA polimerasa para asegurarse que es suficiente para uso en este invento (por ejemplo, para secuenciar DNA), por ser procesiva y tener actividad de desplazamiento de cadena.

Usos

Los usos de las DNA polimerasas como las descritas en lo que antecede de acuerdo con el presente invento incluyen, por ejemplo, síntesis de sondas de DNA largas que contienen múltiples

copias de una secuencia deseada, obtenidas por síntesis con desplazamiento de cadena en un DNA monocatenario, incluyendo dichas sondas largas marcadas con dNTP marcados con una actividad específica muy elevada; marcaje al azar de DNA bicatenario con una alta actividad específica empleando como cebadores oligonucleotídicos degenerados; síntesis de la segunda cadena de cDNA en la clonación de cDNA; mutagénesis al azar de moldes de DNA mono- y bi-catenarios empleando una DNA polimerasa deficiente en exonucleasa en condiciones de baja fidelidad de replicación del DNA; mutagénesis puntual en moldes de DNA bicatenarios y la amplificación de genes o la síntesis de largos fragmentos de DNA bicatenario empleando como cebadores oligonucleótidos sintéticos.

Las DNA polimerasas de tipo $\phi 29$ modificadas descritas en la presente memoria son particularmente útiles para realizar una reacción en cadena de la polimerasa para producir cadenas de DNA extremadamente largas.

Ejemplo 1

P.C.R.

A continuación se presenta un ejemplo de una reacción en cadena de la polimerasa empleando DNA polimerasa de $\phi 29$. En general, la DNA polimerasa puede emplearse simplemente en lugar de las polimerasas Klenow o Taq.

Se mezclan 0,1 pmol de DNA diana con 300 pmol de cada uno de los oligonucleótidos seleccionados (15-20 nucleótidos), y 75 nmol de cada trifosfato de desoxirribonucleósido (1N5 mM) en 50 μ l de un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y cloruro de magnesio 10 mM. La solución se llevó a 95°C durante 10 minutos, y se enfrió a 30°C durante 1 minuto en un baño de agua. Se añadió a la mezcla 1 μ l que contenía 20 ng de DNA polimerasa de $\phi 29$ (de tipo silvestre o un mutante de exonucleasa) y la reacción se dejó transcurrir durante 5 minutos a 30°C, después de lo cual se repitió nueve veces el ciclo de calentamiento, enfriamiento, adición de enzima y reacción. La polimerasa usada se purificó por los métodos usuales.

Las polimerasas de la técnica anterior empleadas en las reacciones en cadena de la polimerasa

fracasaron en proporcionar fragmentos de DNA del intervalo de tamaños mayores de aproximadamente 2 kilobases (*Saiki et al., 239, Science 487, 1988; Keohavong et al. 71 Gene 211, 1988*). Este tamaño relativamente corto se debe probablemente a la estructura secundaria y al impedimento producido por la reasociación del fragmento de DNA, que impide el progreso (avance) de estas DNA polimerasas. Debido a que la DNA polimerasa de $\phi 29$ tiene una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de cadena, es una enzima ideal para la amplificación de DNA produciendo moléculas amplificadas largas, particularmente si se modifican para reducir la actividad de exonucleasa reteniendo al mismo tiempo las características deseables antes mencionadas.

Ejemplo 2

Síntesis de cadenas largas de DNA.

DNA polimerasas de tipo $\phi 29$ modificadas como se ha descrito en lo que antecede permiten la síntesis fácil de moléculas muy largas de DNA útiles en un gran número de aplicaciones, por ejemplo análisis de RFLP, y construcción de sondas de DNA. A continuación se da un ejemplo de esta metodología empleando una DNA polimerasa de $\phi 29$.

DNA M13 monocatenario se hibridó con un cebador oligonucleotídico M13 de 17 nucleótidos. La mezcla de incubación contenía, en 10 μ l, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, 0,5 μ g de DNA M13 cebado, 80 μ m de cada uno de dCTP, dGTP, dTTP, y [α -³²p]dATP y DNA polimerasa de $\phi 29$ (50 ng). Después de la incubación durante 40 minutos a 30°C las muestras se filtraron a través de columnas giratorias de Sephadex[®] G-50 en presencia de dodecil-sulfato sódico al 0,1% y se contó la radiación Cerenkov de la fracción excluida. Para analizar el tamaño del DNA sintetizado, se sometió una muestra a electroforesis en geles alcalinos de agarosa al 0,7% junto con marcadores de longitud del DNA. Los marcadores del DNA se detectaron con bromuro de etidio y el DNA sintetizado se detectó por autoradiografía del gel seco. En 40 minutos de incubación a 30°C se sintetizó un DNA de un tamaño mayor de 70 kb.

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar una secuencia de DNA que incluye las etapas de: asociar un primer cebador y un segundo cebador a cadenas opuestas de una secuencia de DNA bicatenario e incubar la mezcla asociada con DNA polimerasa, en el que la DNA polimerasa empleada es DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada que exhibe menos de 10% de actividad de exonucleasa de la polimerasa correspondiente de origen natural.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que dichos primero y segundo cebadores tienen sus extremos 3' dirigidos uno hacia el otro después de la asociación.

3. Un método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además, después de dicha etapa de incubación, desnaturalizar el DNA resultante, asociar dicho primero y segundo cebadores al DNA desnaturalizado e incubar dicha última mezcla asociada con dicha polimerasa.

4. Un método según la reivindicación 3, en el que dicho ciclo de desnaturalización, asociación e incubación se repite 10-40 veces.

5. Un método según una cualquiera de las rei-

vindicaciones 1 a 4, en el que dicha DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada se deriva de una DNA polimerasa seleccionada de $\phi 29$, Cp-1, PRD-1, $\phi 15$, $\phi 21$, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, SF5, GA-1, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722 y L17.

6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada carece de actividad detectable de exonucleasa.

7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de DNA amplificada tiene una longitud mayor que 10 kilobases.

8. Un método para producir moléculas de DNA de longitud superior a 10 kilobases, que comprende:

proporcionar una molécula molde de DNA;
asociar un cebador a dicha molécula molde;

e
incubar las moléculas cebador y molde asociadas en presencia de DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada y una mezcla de los cuatro diferentes trifosfatos de didesoxinucleósidos, exhibiendo dicha DNA polimerasa de tipo $\phi 29$ modificada menos del 10% de la actividad de exonucleasa que la correspondiente polimerasa de origen natural.

30

35

40

45

50

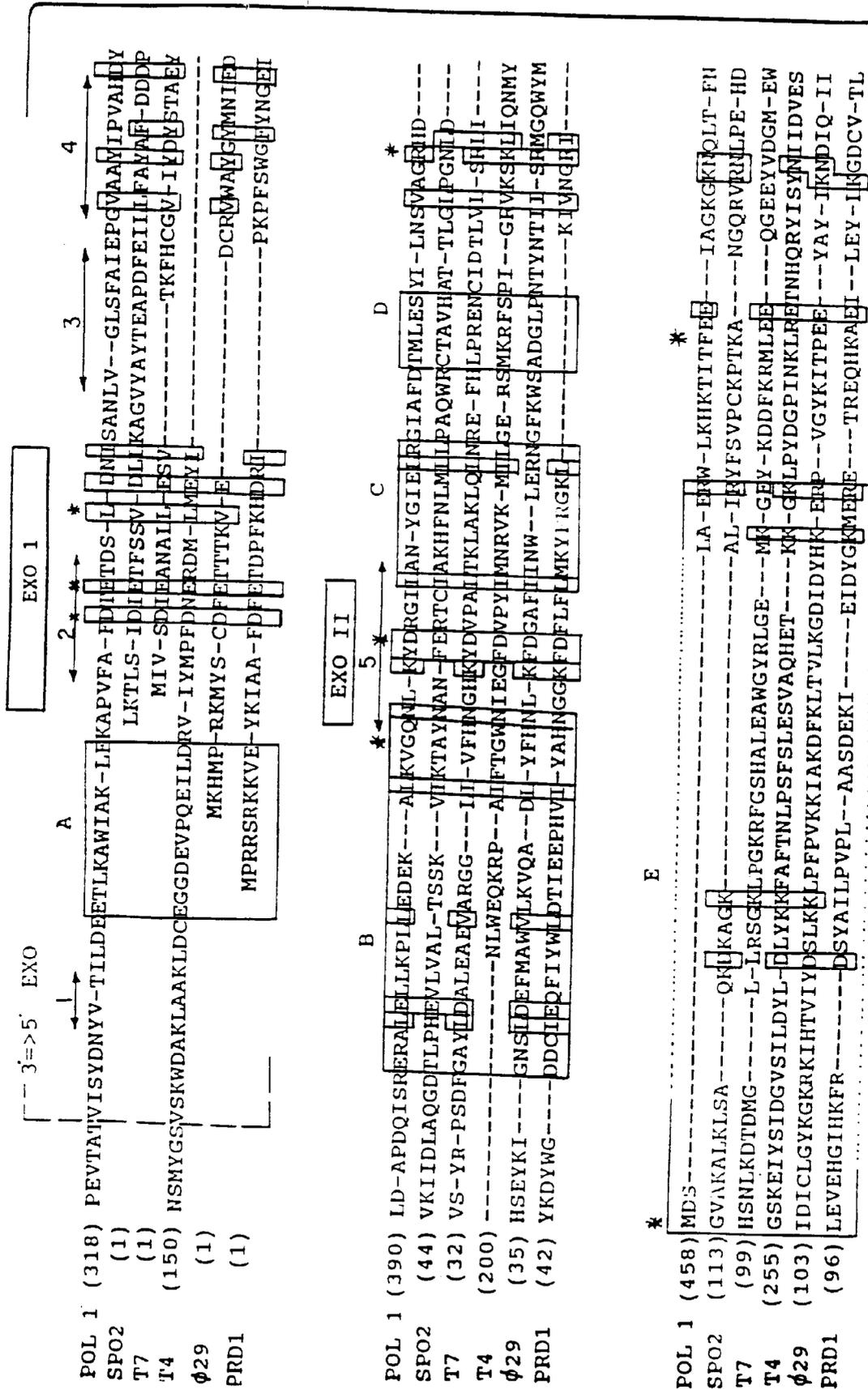
55

60

65

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.



POL 1 (318) PEVTAIVISYDENVV-TILDEETLKAWIAK-LEKAPVFA-FDIEITDS-LINISANLV--GLSFAIEPCVAAMIPVAVIY
 SPO2 (1) LKTLIS-IDIEITPSSV-DLAKAGVYAYTEAPDFEILFAYAF-DDDP
 T7 (1) MIV-SDIEANAIL-ESV-----TKFHCGV-IYDYSTAAY
 T4 (150) NSMYGSVSKWDAKLAAKLDCEGGDEVPEIILDRV-IYMPFDNERDM-LMEYL
 phi 29 (1) MKHMP-RKMYS-CDFEITTKV-E-----DCRVAWVYGMNTEI
 PRD1 (1) MPRRSRKKVE-YKIAA-FDFEITDPPFKIDRI-----PKPFSWGFYNGEII

POL 1 (390) LD-APDQISRERALELLKPILEDEK---ALKVGQNL-KYDRGIIAN-YGIEERGIAFDTMLESYI-LNSVAGRID
 SPO2 (44) VKIIDLAQGDITLPHIEVLVAL-TSSK---VTKTAYMAN-FERTCTAKHFNLMILPAQWRCTAVHAT-TLGIIPGNID
 T7 (32) VS-YR-PSDFGAYLDALFAFVARGG---IIV-VFINGHKKYDVPALTKLAKLQINRE-FIILPRENCIDTLVI-SHII
 T4 (200) ---NLWEQKRP---AIFGTWNIIEGFDVPIIMNRVK-MILGE-RSMKRFSPI---GHVKSKLIQNMV
 phi 29 (35) HSEYKI---GNSLDEFMAWVILKVQA--DL-YFHNL-KFDGAFIINW--LERNGFKWSADGLPNTYNTII-SHMGQWYM
 PRD1 (42) YKDYWG---DDCIIEQFIYWLDTIEEPHVI-YAHNGGKFDLFLMKVIIRGKI-----KIYNGHII

*
 POL 1 (458) MDS-----*
 SPO2 (113) GVAKALKLSA-----QWIKAGK
 T7 (99) HSNLKDTDMG---L-LRSGKLPGKRFGSHALEAWGYRLGE---MK-GEY-KDDFKRMLEB---QGEYVDDGM-EW
 T4 (255) GSKEIYSIDGVSILDYL-DLYKKFAFTNLPFSLESVAQHET-----KK-GRLPYDGPINKLRETNHQRYISYNIIDVES
 phi 29 (103) IDICLGKYGKRKIHTVIYDSLKKLPFPVKKIAKDFKLTVLKGDIDYHK-ERP---VGYKITPEE---YAY-IKNDIQ-II
 PRD1 (96) LEVEHGIHKFR-----DSYAILPVPL--AASDEKI-----EIDYGMERE---TREQHKAELI--LEY-INGDCV-TL

mutador T4

(S) PSI18

(D) PSI31

(P) PSI176

(C) tsme174

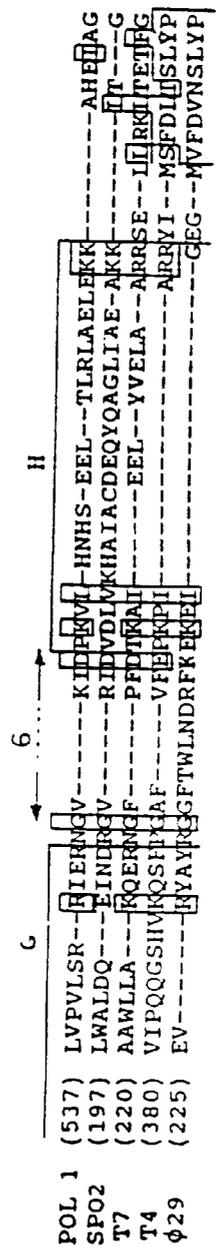
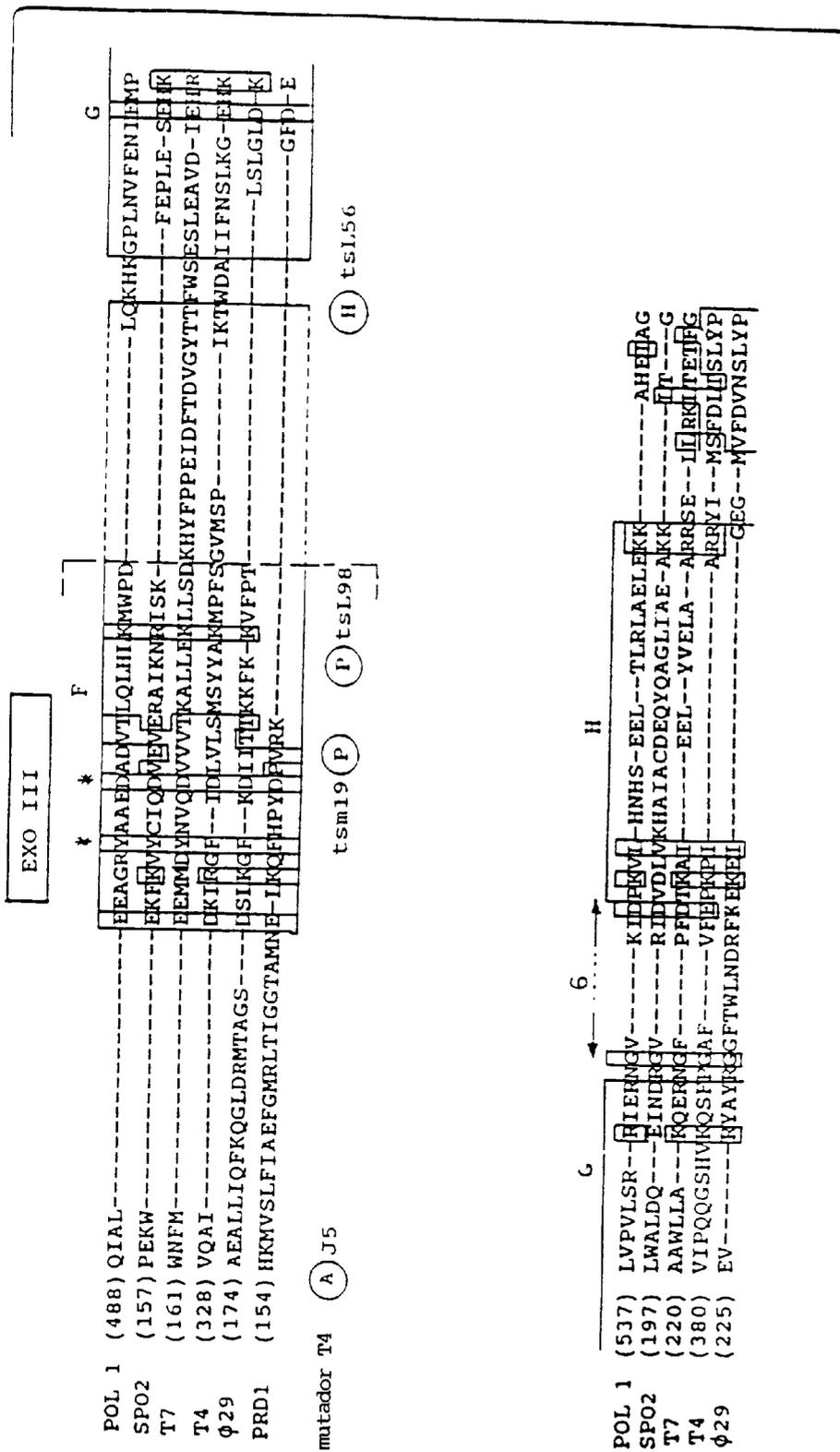


FIG. CONT