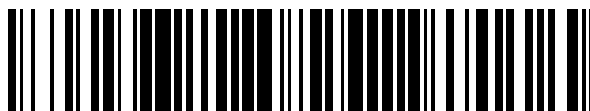


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 167**

21 Número de solicitud: 201130222

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **21.02.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.09.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA
Edificio CACTUS - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es:
DOMÍNGUEZ GERPE, M^a LOURDES

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **NUEVO MÉTODO DE CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS IN VITRO MEDIANTE PCR INVERSA DE CLONACIÓN.**

57 Resumen:

Nuevo método de clonación y mutagénesis in vitro mediante PCR inversa de clonación.

La presente invención se refiere a un nuevo método de clonación dirigida o de clonación y mutagénesis dirigidas y simultáneas que comprende una primera PCR clásica con unos cebadores cuya secuencia híbrida en parte con el inserto y en parte con el vector deseado y puede contener mutaciones, y una segunda PCR inversa de clonación que usa directamente los amplicones generados en la PCR clásica generando nuevos amplicones bicatenarios de largos extremos cohesivos complementarios que circularizan in situ en forma de construcciones génicas estables tipo vector, que ya contienen el fragmento de ADN donado en el vector deseado directamente. La presente invención se refiere también a un kit que comprende las instrucciones para llevar a cabo dicho método y al uso del kit para la clonación dirigida o la clonación y mutagénesis dirigidas y simultáneas.

ES 2 387 167 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevo método de clonación y mutagénesis *in vitro* mediante PCR inversa de clonación

5 La presente invención pertenece al campo de la Biología Molecular, la Ingeniería Genética y la Biotecnología. La presente invención se refiere a un nuevo método *in vitro* para la clonación dirigida o para la clonación dirigida y la mutagénesis dirigida simultánea, usando una PCR inversa de clonación (CiPCR). Además, la presente invención se refiere a un kit que comprende las instrucciones para llevar a cabo dichos métodos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La clonación de un inserto o fragmento de ADN en un vector consiste en unir los correspondientes extremos 5' y 3' del fragmento de ADN a los correspondientes sitios 3' y 5' del vector, respectivamente. La construcción génica circular generada es un vector que puede ser introducido en una célula, donde se replica cuando la célula es cultivada, de forma que su progenie lo hereda, permitiendo de esta manera la obtención de muchas copias idénticas o clones de dicho fragmento de ADN contenido en el nuevo vector.

20

25 Las técnicas usadas mayoritariamente para la clonación de fragmentos de ADN en un vector son muy variadas y se pueden clasificar, según la metodología a usar, en cinco tipos comúnmente conocidos como: métodos de ligamiento de extremos romos, métodos de restricción, métodos de clonación T-A, métodos de recombinación, y métodos LIC (método de clonación independiente de ligasas, del inglés "*ligation independent cloning*").

30 Los métodos de ligamiento de extremos romos se basan en el uso de enzimas de restricción cuyos productos tienen extremos romos. Estos métodos son fáciles de entender, pero experimentalmente son lentos y tediosos, y no permiten la clonación de forma dirigida de manera fácil y

eficiente. Entre sus mayores limitaciones están que dependen de la presencia de las secuencias diana tanto en el inserto como en el vector, que no permiten usar directamente amplicones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con residuos de desoxiadenosina en su extremo 3', que falta
 5 información acerca de las secuencias flanqueantes a las dianas de determinadas enzimas de restricción y que la eficiencia de la ligasa de ADN a la hora de unir extremos romos es baja.

Los métodos de restricción se basan en el uso de enzimas de restricción
 10 cuyos productos tienen extremos cohesivos o protuberantes (en el ADN bicatenario un cierto número de residuos del extremo de la cadena correspondiente sobresale en forma de cadena sencilla). Estos métodos son fáciles de entender, permiten la clonación tanto dirigida como no dirigida del inserto, y una ligación eficiente del inserto al vector. Sin embargo, presentan
 15 importantes limitaciones, como la necesidad de que tanto el vector como el inserto presenten las secuencias diana en los sitios adecuados, la falta de información acerca de las secuencias flanqueantes a las dianas de determinadas enzimas de restricción, el hecho de que cuando se usa una única enzima de restricción solamente se puede clonar de forma no dirigida,
 20 o que la clonación del inserto de forma dirigida requiere el uso de dos enzimas de restricción diferentes. Esto último conlleva un mayor número de pasos experimentales, y sobre todo puede suponer un inconveniente debido a la incompatibilidad de las dianas presentes en el vector deseado y en el inserto. Generalmente, la clonación por restricción requiere un estudio previo
 25 exhaustivo de la estrategia a seguir y de los vectores a utilizar, ocasionando una notable pérdida de tiempo, acrecentada cuando la disposición de las secuencias diana obliga a la clonación del inserto en un primer vector y a la transferencia del inserto a un segundo vector o vector deseado.

30 Los métodos de clonación T-A y similares se basan en la hibridación del inserto con el vector bien a través de residuos de desoxiadenosinas en los extremos 3' protuberantes del inserto que hibridan con residuos de

desoxitimidinas en los extremos 3' protuberantes del vector, o a través de secuencias especiales añadidas, o mediante activaciones de otros residuos terminales. Estos métodos emplean vectores comerciales abiertos en los que se insertan productos de PCR directamente, la mayoría no permite la clonación dirigida, requieren la compra de nuevas alícuotas y generalmente es necesaria la transferencia de la secuencia clonada a un segundo vector deseado. Ejemplos de estos vectores son pGEM T y pGEM®-T Easy de Promega, que usan como insertos fragmentos de ADN con residuos de desoxiadenosina 3' protuberantes y ligasas para la unión del inserto con el vector, o el pCR®II-TOPO de Invitrogen, que emplea fragmentos de ADN con residuos de desoxiadenosina 3' protuberantes y topoisomerasas. Igualmente, "Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit" también usa topoisomerasas y permite la clonación de fragmentos de ADN con extremos romos de forma no dirigida, como por ejemplo usando los fragmentos obtenidos por PCR mediante polimerasas que no introducen residuos de desoxiadenosina en los extremos 3'. Otros vectores como el "Directional TOPO® Cloning permiten la clonación de fragmentos de ADN directamente de forma dirigida con topoisomerasas, y para ello requieren cebadores con secuencias específicas añadidas en sus extremos.

Una alternativa al ligamiento *in vitro* entre el inserto y el vector, es el ligamiento *in vivo*. Un ejemplo es el que ocurre en bacterias que sobreexpresen la ligasa de ADN del bacteriófago T4, en las que se introduce el vector y el inserto en forma lineal para que se produzca su ligamiento dentro de la célula. Los mayores problemas de este método son la baja estabilidad de los ADN lineales dentro de las bacterias, lo que lleva a su degradación parcial y a una disminución de la eficiencia del ligamiento, o a su degradación completa, lo que lleva al fracaso.

Los métodos de recombinación pueden emplear dos estrategias: la clonación *in vitro* mediante recombinasas (ejemplos: la tecnología Gateway® de Invitrogen y la tecnología In-Fusion™ y Creator™ PCR Cloning System

de Clontech) y la clonación *in vivo*, donde el inserto y el vector recombinan dentro de una célula por recombinación homóloga, que es muy eficiente en levaduras y recientemente también se consigue en *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante “clonación RecET” y “clonación λ Red”. Estos métodos permiten
5 clonaciones dirigidas y evitan el empleo de enzimas de restricción y de ligasas, pero son complicados de entender y diseñar, y en ocasiones requieren el diseño y construcción de vectores de destino no comerciales; o requieren cepas especiales de bacterias, o la cotransfección con otro vector para introducir los elementos necesarios para que tenga lugar la
10 recombinación. Además, puede haber baja eficiencia, inestabilidad de los vectores y toxicidad celular.

Los métodos LIC se basan en la creación de extremos cohesivos, los más comunes contienen 12 residuos nucleotídicos, en el inserto y en el vector,
15 complementarios entre sí. Estos métodos permiten la clonación dirigida y son independientes de enzimas de restricción y de ligasas. La hibridación de los extremos cohesivos complementarios del inserto y del vector permiten su estabilización en forma circular formando una construcción génica tipo vector que al introducirla dentro de una célula es unida covalentemente por ligasas
20 intracelulares para la obtención del vector correspondiente. Sin embargo, la generación de estos extremos cohesivos es laboriosa y el almacenamiento de los productos que los contienen es problemático, ya que los extremos son susceptibles de degradación. Para la generación de los extremos cohesivos se emplean distintas estrategias: la T4 ADN polimerasa (Aslanidis y
25 colaboradores (cols.) PCR Methods Appl. 1994 4(3):172-7), la uracil ADN glicosilasa y polimerasas que no pueden amplificar desde residuos de ARN presentes en cebadores mixtos ADN-ARN.

En el mercado hay vectores comerciales como por ejemplo “Affinity® LIC”,
30 de Stratagene o el vector “Genscript pDream 2.1”, pero son muy escasos. Si se requiere su preparación en el laboratorio, esta es generalmente más complicada que la preparación de los insertos.

Por otra parte, existen varias metodologías para la introducción de mutaciones dirigidas o aleatorias en la secuencia de un fragmento de ADN lineal o clonado en un vector, o en la secuencia del propio vector.

5

Los métodos más estudiados y usados para la mutagénesis dirigida en ADN lineal son los de "*overlap extension*" o extensión por solapamiento (Higuchi y cols. *Nucleic Acids Res.* 1988 16, 7351-7367) y sus modificaciones, y los del "*megaprimer*" o megaoligonucleótido (Kammann y cols. *Nucleic Acids Res.* 10 1989 11; 17(13), 5404). Ambos son laboriosos, requieren entre 3 y 4 cebadores, varias PCRs y la clonación *de novo* del inserto mutado en el vector deseado.

Los métodos para introducir mutaciones directamente en la secuencia del ADN clonado en vectores generalmente bicatenarios o en la del propio vector son de varios tipos, como por ejemplo los métodos de restricción, también conocidos como "*cassette mutagenesis*", o los métodos de "*codon cassette-mutagenesis*", los métodos que emplean técnicas LIC o de recombinación, o los métodos en los que se amplifica por PCR el vector completo usando cebadores en los que se incorporan las mutaciones a introducir.

Otros métodos, usados generalmente en vectores monocatenarios, son el "*sticky-feet-directed mutagenesis*", o la mutagénesis dirigida por recombinación, o los que usan estos vectores monocatenarios como pasos intermedios y hacen mutagénesis basada en PCR o PCR y ligasas para, a continuación, clonar todo el inserto mutado en el vector deseado.

La mayoría de estas técnicas requieren elevados conocimientos y experiencia en ingeniería genética y biología molecular. Solamente algunas de ellas pueden llevarse a cabo con kits comerciales, pero, en general, estos kits comerciales están enfocados a fines concretos y su aplicación es

limitada. Ejemplos de estos kits son el QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit o el ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit, ambos de Stratagene.

5 Todos estos métodos que actúan directamente sobre un ADN ya clonado en un vector monocatenario o bicatenario, basados en amplificación de todo el vector por PCR y seguidos de la selección de la construcción génica mutada bien por destrucción del molde original de ADN conteniendo residuos metilados con DpnI *in vitro*, o bien por destrucción del molde original de ADN
10 conteniendo residuos con desoxiuridina en cepas con uracil ADN glicosilasas *in vivo*, o bien por otros procedimientos, son técnicas únicamente de mutagénesis, que no permiten la clonación de la secuencia de interés en un vector distinto de aquel en el que ya están.

15 Por otra parte los métodos de extensión por solapamiento y megaoligonucleótido solamente se aplican a la obtención de ADN lineal con la mutación deseada y, además de ser laboriosos, requieren la clonación del ADN mutado en el vector deseado, *a posteriori*. El método descrito por Miyazaki y Takenouchi (BioTechniques 2002. 33 (5) 1033-1038) y el descrito
20 por Hedge y cols. (Current Science. 2003. 85 (11) 1523-1525) permiten la mutagénesis de una secuencia ya clonada en un vector y emplean una primera PCR clásica y una segunda PCR inversa (iPCR). El método descrito por Clackson y Winter (Nucleic Acid Res. 1989. 17; 10163-10170) y también por Tessier y Thomas (Methods Mol Biol. 1996. 57; 229-37) permite la
25 clonación o la mutagénesis de un fragmento largo de una secuencia de interés por iPCR, para ello Clackson y Winter generan los oligonucleótidos mutados de doble cadena por PCR y Tessier y Thomas los generan de cadena sencilla mediante una PCR asimétrica, sin embargo sus métodos se limitan al uso de vectores monocatenarios en ambos casos que requieren
30 ligamiento con ligasas de ADN. Además los han aplicado mayoritariamente a mutagénesis de fragmentos de ADN y escasamente a clonación, y en ninguno de los casos a clonación y mutagénesis simultáneas en vectores

bicatenarios. El método descrito por Erster y Liscovitch para vectores bicatenarios (Capítulo 12, *In vitro mutagenesis protocols*, 2010, 3ª edición, ed. Jef Braman, Humana Press, 157-174), permite introducir mutaciones por iPCR mediante el uso de oligonucleótidos que cada uno lleva aproximadamente la correspondiente mitad de la secuencia a mutar en sus extremos 5'. Generan así amplicones bicatenarios de una construcción génica que contienen la secuencia con las mutaciones de interés repartida entre los dos extremos romos que, al ligarlos con una ligasa de ADN, circularizan para obtener el vector con la mutación completa incorporada.

10

En general, la clonación y la mutagénesis de ADN exigen amplios conocimientos de ingeniería genética y de biología molecular para diseñar la mejor estrategia que nos ayude a decidir la metodología a emplear. Además, debido a las limitaciones que presentan cualquiera de las metodologías descritas, puede ocurrir que no sea posible la clonación de una secuencia de interés, o que ésta sea posible pero de manera laboriosa, complicada y larga.

20

Para la clonación de fragmentos de ADN en vectores bicatenarios de uso cotidiano en cualquier laboratorio, y de manera especial para aquellos profesionales que no tienen conocimientos ni experiencia en biología molecular ni en ingeniería genética, es conveniente el desarrollo de un nuevo método de clonación dirigida, o de clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas, donde las mutaciones pueden ser de delección, sustitución o inserción, que sea sencillo, fácil y rápido, así como de un nuevo producto que permita llevar a cabo la clonación o la clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas por el nuevo método, y de unas instrucciones para el diseño de la clonación o la clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas, igualmente sencillas, fáciles y rápidas de entender y de usar.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un nuevo método de clonación dirigida, que se basa en el uso de una PCR clásica y una **PCR inversa de clonación (CiPCR)**. El método de la invención es eficiente para la clonación dirigida de grandes fragmentos de ADN (por ejemplo genes completos o promotores de genes), bien mediante **CiPCR de inserción** de la secuencia a clonar en el vector elegido o mediante **CiPCR de sustitución** de la secuencia de un fragmento de ADN ya contenido en el vector elegido por la del nuevo fragmento a clonar, o para su clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas.

En el caso de la clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas, la clonación del fragmento largo de ADN se lleva a cabo por **CiPCR de inserción o sustitución** y las mutaciones dirigidas simultáneas a la clonación se introducen a través de la PCR clásica de amplificación del inserto, previa a la CiPCR, mediante el uso de los oligonucleótidos cebadores que contienen las secuencias apropiadas para introducir las mutaciones (sustituciones, inserciones o deleciones) en los sitios de interés. Estos oligonucleótidos pueden sintetizarse químicamente o por ingeniería genética, si su tamaño es mayor que el que permite la síntesis química.

El método es fácil de entender y de diseñar y más sencillo de usar que los métodos que se emplean hasta la fecha, por lo que no requiere poseer elevados conocimientos de ingeniería genética ni de biología molecular.

Este método permite la clonación dirigida de una secuencia de interés en cualquier vector bicatenario V que contenga al menos un origen de replicación y un gen de selección y que sea preferiblemente circular. El método permite clonar de forma dirigida la secuencia de interés contenida en un vector, en otro vector, y también permite clonar la secuencia de interés contenida en una muestra de ADN genómico o en una muestra de ADN

complementario (ADNc) generado a partir de ARN mensajero o en el producto de una PCR, en el vector elegido. El método también permite clonar de forma dirigida la secuencia de interés en un ADN bicatenario lineal que contenga una serie de elementos funcionales, que incluyan al menos un
5 origen de replicación y una secuencia de un gen de resistencia o de selección, y generado por ingeniería genética *in vitro*, como por ejemplo mediante amplificación de la secuencia de cada elemento de forma individual por PCR, y posterior unión por PCR de extensión por solapamiento.

10

El término “clonación”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al proceso que permite la generación de copias de un fragmento de ADN, como puede ser la inserción de una secuencia nucleotídica de interés en un vector o en un ADN lineal con las características que se han descrito
15 anteriormente, que pueda ser replicado dentro de una célula.

20

El término “hibrida”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la unión de cadenas de ADN sencillo con secuencias complementarias. En Biología Molecular, la complementariedad es una propiedad de los ácidos nucleicos de doble cadena. Cada cadena es complementaria a la otra de forma que los pares de bases nitrogenadas de
20 ambas están conectados por dos o tres puentes de hidrógeno.

25

La mutagénesis es el proceso por el cual se introducen mutaciones, es decir, cambios, en una secuencia nucleotídica, que pueden ser de tipo inserción, sustitución o delección. La mutagénesis puede ser al azar o dirigida, en cuyo caso se modifican exacta y únicamente los nucleótidos deseados.

30

El término “vector”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una construcción génica o secuencia de ADN que contiene una serie de elementos funcionales, que incluyen al menos un origen de replicación, secuencias de genes de resistencia o de selección, secuencias

de control, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión de factores de transcripción o elementos reguladores). El vector puede incluir plásmidos bacterianos, 5 vectores virales, bacteriófagos, cósmidos y otros vectores bien conocidos y documentados en el estado de la técnica, así como los ADN lineales generados *in vitro* con las características descritas anteriormente. Un vector como el que se acaba de describir, una vez circularizado, es capaz de replicarse bajo su propio control, y de replicar con él el segmento de ADN 10 que lleva unido.

El término “secuencia de control” se refiere a secuencias de nucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere 15 dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal y señales de terminación; en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” 20 incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

El término “origen de replicación”, tal y como se emplea en la presente 25 descripción, se refiere a una secuencia de nucleótidos donde se forma una horquilla de replicación y donde se inicia la replicación del ADN.

El término “gen de selección”, tal y como se emplea en la presente 30 descripción, se refiere a un gen que codifica para una proteína que confiere una característica distintiva al organismo en el que se expresa, como puede ser que sobreviva a la presencia de un antibiótico, que produzca una sustancia coloreada en presencia de un reactivo determinado o que emita

5 luz. Un gen de resistencia a antibiótico codifica para una proteína que confiere a la célula que la expresa, que normalmente sería sensible al antibiótico, la capacidad de superar el efecto del antibiótico. Dicha proteína suele ser un enzima que hidroliza el antibiótico en cuestión, inactivándolo, o puede ser también una bomba que lo expulsa al exterior de la célula.

10 Además, el método del primer aspecto de la invención no requiere estudio alguno sobre dianas de corte específicas para enzimas de restricción, ya que no se requieren para la clonación. Este método permite clonar de forma dirigida cualquier fragmento de ADN, como por ejemplo secuencias de genes completos o de promotores. Los autores de la presente invención han demostrado que por este método es posible clonar fragmentos de ADN de hasta al menos 2.300 pares de bases.

15 Fragmentos de imposible clonación con la metodología clásica de restricción, por la ausencia de puntos de corte adecuados en el ADN a clonar, se pueden clonar mediante el uso de esta metodología, que además de eliminar la necesidad de los cortes del vector y del inserto con enzimas de restricción, así como las purificaciones intermedias de estos productos y su ligamiento, evita también los laboriosos cambios de vector que en 20 ocasiones son necesarios en la metodología de restricción.

25 En el método del primer aspecto de la invención, la CiPCR permite la clonación dirigida mediante el uso de los oligonucleótidos cebadores diseñados de manera que el inserto se clona en la orientación deseada, determinada por el diseño de dichos cebadores, que se adapta para cada fragmento de ADN a clonar y para cada vector, incluyendo cada ADN lineal generado *in vitro*, de destino.

30 Los productos obtenidos por el método del primer aspecto de la invención pueden introducirse por transformación en cualquier tipo de *E. coli*, y no requieren las exigencias de la clonación por recombinación homóloga RecET

o λ Red en *E. coli*. Cepas de *E. coli* de uso universal como las DH5 α o las TG1 son transformadas perfectamente por las construcciones génicas generadas por CiPCR.

5 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de clonación dirigida o de clonación y mutagénesis dirigidas caracterizado porque comprende una primera etapa (a):

10 a. diseñar una pareja de oligonucleótidos F (directo) y R (reverso) donde:

i. las secuencias de los extremos 3' (C_i) hibridan total o parcialmente con la secuencia a clonar o a clonar y mutar,

15 ii. las secuencias de los extremos 5' (T) hibridan total o parcialmente con las secuencias de un vector V que flanquean el lugar donde se va a insertar el ADN a clonar o a clonar y mutar, y

20 iii. el vector V es un vector bicatenario preferentemente circular que comprende al menos un origen de replicación y preferentemente al menos un gen de selección.

25 Las secuencias C_i , localizadas por tanto en los extremos 3' de los oligonucleótidos F y/o R y que hibridan con la secuencia del inserto, se diseñan como se diseñarían unos cebadores para obtener los amplicones por PCR clásica. En el oligonucleótido F, C_i corresponde con la secuencia de la región identificada como C_{iF} en el inserto "I", y en el oligonucleótido R C_i corresponde con la secuencia de la región identificada como C_{iR} (figura 1).

30 Las secuencias T, que hibridan con el vector o con el ADN lineal, se localizan en los extremos 5' de F y de R y corresponden a las regiones identificadas como T_F y T_R en el vector V de la figura 1, se diseñan partiendo

de los residuos nucleotídicos señalados con dos asteriscos ** o dos ## respectivamente en el vector V hacia los extremos 5', de manera que se añaden directamente a los extremos 5' de las secuencias C_{IF} y C_{IR} mediante unión a los extremos 3' de las secuencias T.

5

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, los oligonucleótidos F y/o R comprenden una mutación M de tipo inserción entre la secuencia C_i y la secuencia T, donde M comprende al menos un nucleótido y no hibrida con la secuencia a clonar o a clonar y mutar, ni con el vector V.

10

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, los oligonucleótidos F y/o R comprenden al menos una mutación M' en C_i, donde la mutación puede ser una inserción, una sustitución o una delección y no hibrida con la secuencia a clonar o a clonar y mutar, ni con el vector V.

15

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, los oligonucleótidos F y/o R comprenden al menos una mutación M'' en T, donde la mutación puede ser una inserción, una sustitución o una delección y no hibrida con la secuencia a clonar o a clonar y mutar, ni con el vector V.

20

Las secuencias M, M' y M'' son por lo tanto todas para introducir mutaciones y ninguna hibrida con la secuencia a clonar o a clonar y mutar, ni con la del vector V. Como máximo se pueden introducir dos mutaciones M, que pueden ser únicamente de tipo inserción, una por cada oligonucleótido F o R entre la región C_i y la región T. Sin embargo, mutaciones M' se pueden introducir una o varias por cada oligonucleótido F o R, que pueden ser inserciones, sustituciones y/o delecciones puntuales o múltiples, cuyas secuencias se añaden en los correspondientes sitios de las regiones C_i. En cuanto a las mutaciones M'' también se pueden introducir una o varias por cada oligonucleótido F o R, que pueden ser inserciones, sustituciones y/o

25

30

deleciones puntuales o múltiples, cuyas secuencias se añaden en los correspondientes sitios de las regiones T.

5 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, después de la etapa (a) se lleva a cabo la siguiente etapa (b):

b. Amplificar mediante PCR la secuencia a clonar o a clonar y mutar empleando los oligonucleótidos F y R diseñados en la etapa (a).

10 Los oligonucleótidos F y R que se emplean como cebadores en la PCR clásica de amplificación del inserto de la etapa (b), están diseñados de forma que se inicia la PCR a través de la hibridación de las secuencias C_i de los extremos 3' con la región correspondiente de cada una de las hebras del ADN que contienen la secuencia del inserto "i" a clonar, o a clonar y mutar
15 en aquellos casos que contengan secuencias M, M' y/o M'' para introducir las mutaciones deseadas.

Finalizada la etapa (b), se obtiene el amplicón bicatenario, cuyas cadenas individuales, que denominamos A y B, son complementarias entre sí y tienen
20 extremos romos. Dado que la etapa (b) consiste en una PCR clásica con un elevado número de ciclos, donde aunque en los primeros ciclos se obtienen amplicones de tamaños variables debido a que no hay señal de fin de la elongación, en ciclos más avanzados son los propios cebadores F y R los que acaban delimitando el tamaño del amplicón, ya que se usan como
25 moldes en cada nuevo ciclo de la PCR.

Los amplicones A y B, conteniendo el inserto y en su caso las mutaciones M, M' y M'' deseadas, pueden usarse directamente en la siguiente etapa (c), o se pueden reamplificar con unos oligonucleótidos F_v y R_v diseñados a
30 medida del vector V, de manera que contengan las secuencias T_F y T_R o una parte respectivamente (ver vector V en figura 1), y a continuación se le añaden entre 12 y 18 nucleótidos más, los flanqueantes a T_F y a T_R (ver

vector V en figura 1) hacia el extremo 5' de la correspondiente cadena del vector V. Estos nuevos amplicones A' y B' usados en la CiPCR en lugar de los A y B permiten aumentar la eficiencia de la CiPCR en aquellos casos en los que se requiera.

5

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, en la PCR de la etapa (b) se emplea una ADN polimerasa con actividad 3'-5' exonucleasa.

10 Para la obtención de A y B, o de A' y B' se usa preferiblemente una ADN polimerasa que no introduce residuos en el extremo 3'. Es preferible no utilizar polimerasas que poseen baja o nula actividad 3'-5' exonucleasa, puesto que introducen un residuo fundamentalmente de desoxiadenosina protuberante en el extremo 3' no guiado por el molde, por lo que ese residuo
15 extra no codificado impediría el cebado de la CiPCR de la etapa (c), y por lo tanto su funcionamiento, lo que podría llevar a un fracaso en la clonación del inserto.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, después de
20 la etapa (b) se lleva a cabo la siguiente etapa (c):

c. Clonar la secuencia amplificada en la etapa (b) en el vector V mediante una CiPCR.

La CiPCR se caracteriza porque:

25

1. Se obtienen productos que son amplicones bicatenarios lineales complementarios, como los E y G que se muestran en a figura 4A, tanto en las secuencias provenientes de la amplificación de las dos cadenas del vector V como en las secuencias de los amplicones A y B que contienen el
30 inserto a clonar o a clonar y mutar, y en cualquiera de los casos con largos extremos cohesivos de hasta varios miles de residuos nucleotídicos (figura

6), complementarios también entre sí. En la PCR e iPCR clásicas se obtienen amplicones bicatenarios de extremos romos.

2. El tamaño de los amplicones bicatenarios E-G está exactamente delimitado desde el primer ciclo mediante las dos señales derivadas de las secuencias contenidas en cada una de las cadena A y B a través de la
5 hibridación con el vector usado como molde, las Tc y las T, de las cuales la primera señala el inicio y la segunda la terminación de la elongación por la polimerasa (figuras 2 y 3), hecho que no ocurre ni en la PCR clásica ni en la iPCR clásica.

10

3. Los productos E y G, por sus características de complementariedad total (figura 6), se estabilizan en forma circular *in situ* mediante hibridación de sus largos extremos cohesivos complementarios formando construcciones
génicas estables tipo vector V' (figuras 5 y 7). Estas construcciones génicas
15 estables V' pueden llegar a contener varios miles de residuos nucleotídicos, y aunque permanezcan en ellas dos cortes por la ausencia de los dos enlaces covalentes entre cada uno de sus dos pares de residuos terminales, dado que al hibridar, el corte de cada cadena no se localiza enfrente del de la otra cadena sino que son distantes espacialmente, la energía liberada por
20 los múltiples enlaces de hidrógeno que se forman durante la hibridación de los largos extremos cohesivos contribuye, juntamente con otros factores como el efecto hidrofóbico, a su estabilización y, por lo tanto, la transformación bacteriana es posible sin necesidad de una ligación previa *in vitro*.

25

4. Los productos de CiPCR E y G no puedan actuar como moldes. El especial diseño de los oligonucleótidos F y R para la obtención de los amplicones bicatenarios A y B, a diferencia de las PCR e iPCR bicatenarias clásicas, no permite que los amplicones E y G puedan ser copiados en ciclos
30 posteriores, por lo que su amplificación transcurre en cada ciclo de manera aritmética y no geométrica como en la PCR e iPCR clásicas. Mediante el cebado de E y G con las secuencias Tc de los amplicones A y B, como se

muestra en la figura 4B entre los amplicones A y G, la polimerasa no puede catalizar la reacción de polimerización puesto que desde el extremo 5' (el único disponible en A) no puede elongar. Tan solo las cadenas C y D del vector V pueden servir de molde (figura 3), y aunque este mecanismo lleva a la obtención de un menor número de copias que en una PCR clásica (amplificación aritmética en CiPCR frente a geométrica en PCR clásica), tiene dos grandes ventajas:

La primera: los amplicones que se obtienen son directamente construcciones génicas bicatenarias vectoriales estables ya clonadas, y

La segunda: minimiza la perpetuación de posibles mutaciones generadas durante la amplificación por la polimerasa, puesto que siempre amplifica del molde original.

5. La estabilidad de las construcciones génicas V' desfavorece la actuación de la polimerasa en la producción de posibles amplicones mixtos A+V+B de extremos romos (figura 6) puesto que no los hemos observado experimentalmente al menos de manera significativa (figura 8). Esta estabilidad de las construcciones génicas E-G en forma de vector circular probablemente se inicia por una primera hibridación entre las dos cadenas E-G de manera que una vez unidas forman una sola entidad molecular, promoviendo la hibridación intramolecular total rápida entre los otros dos extremos complementarios libres de ellas mismas, o puede transcurrir incluso de forma simultánea. Además, este proceso se puede optimizar a favor de una mayor eficiencia en la clonación buscando las condiciones experimentales que permitan que la hibridación intramolecular sea más favorable que la elongación por la polimerasa.

El método del primer aspecto de la invención permite, además de la clonación dirigida de genes y otros fragmentos de ADN, la introducción de hasta dos inserciones M simultáneas a la clonación entre los extremos del inserto "i" y del vector V, y/o una o múltiples mutaciones simultáneas M' y/o M'' en los extremos del inserto o en las zonas del vector V flanqueantes al

lugar de inserción del inserto en el vector V, que pueden ser sustituciones, y/o deleciones y/o inserciones.

5 Por lo tanto, las construcciones génicas resultantes de la etapa (c) son mayoritariamente como las construcciones génicas V' mostrada en las figuras 5 y 7, por lo que el método del primer aspecto de la invención evita el uso de ligasas *in vitro* previo a la introducción de la nueva construcción génica V' dentro de las células puesto que, al usar vectores bicatenarios y amplicones bicatenarios conteniendo los insertos y las mutaciones
10 deseadas, durante la CiPCR se generan también amplicones bicatenarios con largos extremos cohesivos y complementarios que hibridan entre sí formando una construcción génica circular estable V' que, una vez introducida dentro de la célula, no es degradada y puede ser ligada y replicada *in vivo*. Por lo que tanto la metodología de restricción como la de
15 ligamiento de extremos romos con ligasas muestran desventajas con respecto a este método y, en especial, la de ligamiento de extremos romos, por su baja eficiencia en la reacción de ligamiento *in vitro* previa a la introducción de la construcción génica dentro de la célula.

20 El método del primer aspecto de la invención usa vectores V bicatenarios preferiblemente circulares, preferiblemente metilados, pero también podrían usarse los vectores bicatenarios abiertos y los productos de ADN bicatenario lineales generados por ingeniería genética como se describió anteriormente. Por lo tanto, el uso del método del primer aspecto de la invención no está
25 restringido a ningún vector V concreto, ni a su estado lineal o circular, ni a la presencia de residuos con desoxiuridina, ni a las limitaciones de las dianas de restricción del sitio de clonación múltiple o a los sitios de recombinación, como los métodos de clonación T-A, los LIC, los de restricción o los de recombinación y se amplía además a otros ADN bicatenarios lineales con las
30 características descritas anteriormente y no provenientes de la apertura de vectores circulares.

El método del primer aspecto de la invención permite eliminar, de manera simultánea a la clonación, las secuencias diana de los sitios de clonación por restricción, recombinación, y/o de otras secuencias no deseables, como pueden ser las regiones codificadoras de un gen clonado previamente, o la
5 secuencia de un promotor, todas ellas localizadas entre los sitios de inserción del nuevo ADN a clonar (que en las figuras se identifica desde el sitio marcado con los dos asteriscos ** hasta el marcado con ##), y que por lo tanto no interesa que permanezcan en el vector V'.

10 El método del primer aspecto de la invención es diferente a los descritos hasta la fecha, ya que permite tanto la clonación dirigida, como la clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas de la secuencia a clonar directamente mediante el uso de una CiPCR.

15 La clonación dirigida y la clonación y mutagénesis dirigidas simultáneas se consiguen gracias al diseño de los dos oligonucleótidos cebadores F y R, como se ha descrito anteriormente, que permiten, bien directamente o bien formando parte de una molécula de ADN de mayor tamaño, como los amplicones bicatenarios A y B o A' y B', alcanzar los siguientes cuatro
20 objetivos:

Primer objetivo: el cebado secuencial de dos PCRs: una PCR clásica y una CiPCR.

25 Se consigue mediante la introducción de las secuencias C_i en cada uno de los extremos 3' de los oligonucleótidos F y R (figura 1), que son las que hibridan con el inserto y actúan de cebadores en la PCR clásica de amplificación del inserto "i" a clonar (figuras 1 y 2) para obtener los amplicones bicatenarios A y B que se describen en la etapa (b).

30 Las secuencias T, que se localizan en los extremos 5' de F y de R (figura 1), y también en los extremos 5' de los amplicones A y B (figura 2), generan durante la PCR clásica de la etapa b) las correspondientes secuencias T_c localizadas en los extremos 3' de A y B (figura 2). Tanto las secuencias T

como Tc de la misma cadena A o B del amplicón bicatenario generado en la PCR clásica hibridan con las secuencias complementarias en la correspondiente cadena del vector V (figura 3), pero son las secuencias Tc de A y B las que actúan de cebadores para llevar a cabo la elongación en la CiPCR, como si se tratara de una iPCR, pero no clásica.

Segundo objetivo: la delimitación del tamaño exacto del amplicón de la CiPCR desde el primer ciclo.

A diferencia de la iPCR clásica en la CiPCR se delimita el tamaño del amplicón desde el primer ciclo. Se consigue mediante la hibridación de las secuencias T de los extremos 5' de cada uno de los amplicones A y B con las secuencias complementarias correspondientes de cada una de las cadenas C y D del vector V (figura 3). En la CiPCR, la polimerasa elonga desde el extremo 3' (desde las secuencias Tc) hasta que el molde deja de estar disponible en la región de C o D donde está hibridado con las correspondientes secuencias T. Por lo tanto T es una señal de terminación, que juntamente con la señal Tc de iniciación, delimitan el tamaño exacto del amplicón desde el primer ciclo. Como consecuencia, aunque los amplicones A y B pueden hibridar respectivamente con los amplicones G y E que se obtienen en la CiPCR (figura 3, 4A y 4B), estos no pueden actuar como nuevos moldes, puesto que tras la hibridación de G y E con A y B respectivamente, solamente quedan disponibles las regiones 3' de los amplicones E y G (figura 4B) para ser amplificadas, y desde los extremo 5' de A y de B la polimerasa no puede elongar. Por lo tanto solamente puede tener lugar la amplificación desde el molde original.

El resultado final es que en la CiPCR se obtienen fragmentos de ADN bicatenarios con largos extremos cohesivos complementarios entre sí, que al hibridar, bien secuencialmente a través de hibridaciones parciales iniciales como las que se muestran en la figura 6, o simultáneamente como se muestra en la figura 5, llevan a una circularización de las dos cadenas E y G, obteniéndose la construcción génica V' de la figura 5. Esta construcción

génica V' es más estable que la que se forma en la clonación tipo LIC, debido a que con el método de la invención se forman largos extremos protuberantes con un único corte por cadena, mientras que en la clonación tipo LIC se forman vectores más inestables con extremos protuberantes más cortos y con dos cortes por cada cadena.

Ante la hibridación que se muestra en la figura 6B, dependiendo de las características intrínsecas de cada secuencia involucrada y de las condiciones experimentales de la CiPCR, sería teóricamente posible la elongación por la polimerasa a partir de los correspondientes extremos 3' de E y de G para obtenerse los productos lineales no deseados con extremos romos A+B+V. Además, puesto que estos productos pueden funcionar como nuevos moldes podría darse una PCR clásica simultánea con la CiPCR, de la que sería de esperar una amplificación geométrica, y puesto que tras digestión con DpnI, en nuestros ensayos no hemos observado, al menos de forma relevante, la producción de fragmentos del tamaño correspondiente a A+B+V, como se muestra a modo de ejemplo en la figura 8 para la clonación del gen humano *SP1* que codifica para la proteína "Specicity Protein 1", este mecanismo parece desfavorecido. Aún en caso que se obtuviesen, estos productos no suponen un problema puesto que, al no ser necesario el uso de una ligasa de ADN, tras degradación de los vectores molde originales V con DpnI, la transformación de *E. coli* con la mezcla de los restantes productos de la CiPCR favorece la degradación de los amplicones A+B+V de ADN de extremos romos que permanecen en forma lineal frente a la protección que le confiere la circularización de E y G para formar las construcciones génicas V' altamente estables, mostradas en la figura 5, lo que, tras transformación de *E. Coli*, favorece su ligamiento catalizado intracelularmente para la formación del enlace fosfodiéster entre el fosfato en la posición 5 del residuo nucleotídico del extremo 5' y el hidroxilo en la posición 3 del residuo nucleotídico del extremo 3' para unir covalentemente cada uno de los dos pares de residuos nucleotídicos de los extremos de

cada cadena E y G, llevando por tanto a la obtención del vector circular bicatenario E-G deseado (V').

5 Tercer objetivo: la inserción orientada y dirigida del fragmento a clonar directamente en el vector V seleccionado, tanto por inserción directa de su secuencia (**CiPCR de inserción** de la secuencia a clonar) como por sustitución de una secuencia de un fragmento de ADN ya clonado previamente en el vector V seleccionado por la secuencia del nuevo fragmento de ADN a clonar (**CiPCR de sustitución**).

10

Este objetivo también se consigue gracias al diseño de los oligonucleótidos F y R. Cada uno de los oligonucleótidos contiene las dos secuencias C_i y T correspondientes que determinan la orientación del inserto, así como el lugar de inserción del inserto contenido en los amplicones A y B en el vector V.

15

Las secuencias T de los oligonucleótidos, y por tanto sus complementarias T_c en los amplicones A y B definen el lugar exacto de inserción. El inicio de las zonas que flanquean el lugar de inserción en las cadenas C y D del vector V y que hibridan con las secuencias T y T_c de los amplicones A y B respectivamente se indican con ** y con ## en la figura 1 y coinciden con el

20

punto exacto de inserción. Si los sitios ** y ## son contiguos el nuevo ADN se inserta en esa posición exactamente y no tiene lugar la eliminación de nucleótidos en el vector V'. Si los sitios ** y ## son distantes, en el proceso de clonación se elimina en el vector V' la secuencia del vector V comprendida entre ambos sitios

25

simultáneamente a la inserción del ADN a clonar.

Cuarto objetivo: la introducción opcional de mutaciones en las regiones de los extremos del inserto o del vector de forma simultánea a la clonación del inserto. Se consigue mediante:

30

Introducción de una o de las dos únicas inserciones M posibles (una por cada oligonucleótido) en los oligonucleótidos F y/o R entre las secuencias

del inserto "i" y del vector V, o sea entre la secuencia C_i y la T (figura 1), y son los nucleótidos de las secuencias C_i y T flanqueantes a la inserción los que hibridan con la secuencia del inserto "i" o del vector V, y/o introducción de una o de las múltiples mutaciones M' y M'' posibles en las secuencias de los extremos del inserto y en las secuencias flanqueantes al lugar de inserción en el vector V respectivamente, que en los oligonucleótidos F y/o R corresponden a las secuencias C_i y T, respectivamente. Estas mutaciones M' y M'' pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones. En las inserciones son los nucleótidos de las secuencias flanqueantes a la inserción los que hibridan con la secuencia del inserto o del vector V. En las deleciones, se eliminan los nucleótidos correspondientes y la secuencia del oligonucleótido F o R hibrida con las secuencias localizadas a los lados de la secuencia que se quiere deleccionar en el inserto "i" o el vector V. En el caso de las sustituciones, la secuencia del oligonucleótido difiere de la secuencia con la que hibrida en aquellos nucleótidos que se quieren modificar.

Las mutaciones M, M' y M'' de tipo inserción pueden añadir desde uno hasta múltiples nucleótidos a las correspondientes regiones de V' entre las secuencias de los extremos del inserto y del vector V o en las secuencias provenientes de los extremos del inserto y del vector V (figuras 1 y 7), incluso etiquetas o marcadores enteros, como por ejemplo, pero sin limitarse, hemaglutinina (HA), polihistidinas, cualquier etiqueta o marcador conocido por un experto en la materia, como también, por ejemplo, pero sin limitarse, un codón de iniciación, un codón de parada, o una secuencia Kozak, como demuestran los ejemplos de la presente memoria. Las mutaciones de deleción eliminan uno o varios nucleótidos, o etiquetas, o marcadores enteros comprendidos en las secuencias C_i y/o T provenientes del inserto "i" y del vector V, y las mutaciones de sustitución intercambian uno o varios nucleótidos comprendidos en las secuencias C_i y/o T provenientes del inserto "i" y del vector V.

Las mutaciones M, M' y M'' se denominan de igual forma en ambos oligonucleótidos F y R, pero puede haber dos secuencias M diferentes, una proveniente de cada oligonucleótido, y múltiples y diferentes secuencias M' y M'' provenientes de cada uno de los dos oligonucleótidos.

5

Según las secuencias M, M' y M'' que se desee introducir y/o mutar se obtendrán las construcciones génicas circulares bicatenarias V' correspondientes. Los productos que se pueden obtener van a variar en cada caso dependiendo de las secuencias M, M' y M''. A modo de ejemplo se muestra un esquema en la figura 7 con posibles productos que se pueden obtener; para mayor claridad se muestra solamente una de las cadenas de la construcción génica bicatenaria V'.

10

El número de nucleótidos totales de las secuencias M, M' y M'' no está limitado en la CiPCR, sino en las etapas previas. Las restricciones provienen fundamentalmente de las limitaciones inherentes a la síntesis química de los oligonucleótidos, puesto que no suelen superar los 135 residuos, por lo que el número máximo de residuos a insertar o sustituir aportados por M, M' y M'' está delimitado por la diferencia entre el número total de nucleótidos de las secuencias C_i y T y el de los oligonucleótidos sintetizados químicamente. Hay que tener en cuenta que si M' y M'' son deleciones, no añaden nucleótidos a los oligonucleótidos F y R.

15

20

Esto tampoco supone un problema para el método puesto que cuando se deseen introducir múltiples mutaciones M, M' y M'' no abarcables con los oligonucleótidos cebadores sintetizados químicamente para llevar a cabo la obtención del inserto, se puede recurrir a su obtención mediante ingeniería genética. Para ello se puede recurrir a otros métodos de PCR que sirvan para introducir mutaciones en ADN lineal, como pero sin limitarse al del megaoligonucleótido o al de extensión por solapamiento y sus variantes, y generar así los amplicones A y B para ser usados en la correspondiente CiPCR.

25

30

- Como alternativa y para evitar estos métodos de ingeniería genética, que son laboriosos, se recomienda el uso de varias CiPCR secuenciales usando oligonucleótidos sintetizados químicamente, tanto para delecciones como para clonaciones de múltiples fragmentos de ADN, y aprovechando las mutagénesis simultáneas que sean posibles a través de M, M' y M'', para minimizar el número de CiPCRs en la consecución de los objetivos que se planteen
- 10 La iPCR es una técnica que se usó inicialmente para la obtención de secuencias de fragmentos de ADN lineal de los que solamente se conocía una secuencia parcial. Tras su circularización se pueden amplificar mediante PCR con los oligonucleótidos diseñados hacia el exterior (invertidos) a partir de la secuencia parcial conocida, de manera que se obtienen amplicones
- 15 conteniendo en sus extremos las secuencias conocidas. Estos amplicones son ahora secuenciados para elucidar el resto de la secuencia objeto de estudio. Por lo tanto se diferencia de la PCR clásica en que requiere la circularización previa del molde a amplificar, en que los dos cebadores hibridan en la misma zona del molde o en zonas adyacentes o próximas, y
- 20 en que la orientación de dichos cebadores es la opuesta a la de una PCR clásica. Como producto de la reacción de iPCR se obtienen amplicones de doble cadena de extremos romos pero que, a diferencia de la CiPCR, pueden actuar como moldes en el siguiente ciclo.
- 25 En la presente memoria, CiPCR es un método de clonación mediante una "PCR inversa de clonación", donde el producto obtenido son amplicones de doble cadena, que no pueden ser copiados en los ciclos siguientes de la CiPCR, que tienen largos extremos cohesivos que son los que permiten su circularización a una construcción génica estable V' tipo vector y por tanto la
- 30 clonación simultánea y directa del inserto.

En una realización preferida, el método del primer aspecto de la invención, se caracteriza porque después de la etapa (c) se lleva a cabo la siguiente etapa (d):

- 5 d. Digerir el producto de la etapa (c) con una ADN endonucleasa dependiente de metilación.

Preferiblemente, la ADN endonucleasa dependiente de metilación es DpnI.

10 El término “digerir”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la acción enzimática de una endonucleasa, que rompe los enlaces entre los nucleótidos que forman las cadenas de ADN, destruyéndolas. Una endonucleasa dependiente de metilación es aquella que sólo corta el ADN cuando reconoce su diana y además dicha diana presenta un nucleótido metilado. Como se ilustra en la figura 5, el enzima DpnI es capaz de eliminar selectivamente el molde V (cadenas C y D) de la reacción de la etapa (c) y no las moléculas de ADN recién sintetizadas en dicha etapa, ya que las moléculas recién sintetizadas mediante PCR no están metiladas, mientras que las moléculas de vector V que han actuado como molde, provenientes de la extracción y purificación del vector V de un cultivo de una célula con enzimas metilasas, sí lo están.

15

20

25 Cuando el vector V de la etapa (a) no es circular, sino un ADN lineal bien generado *in vitro* con las características descritas anteriormente o proveniente de un vector abierto, se puede prescindir de la etapa (d) y se procedería directamente con a etapa (e) que se describe a continuación. Los ADN lineales son degradados y solamente permanecen las construcciones V' generadas en la CiPCR.

30 En una realización preferida, el método del primer aspecto de la invención se caracteriza porque después de la etapa (d) se lleva a cabo la siguiente etapa (e):

- e. Introducir los productos de la etapa (d) en una célula.

La célula en la que se introducen los productos de la etapa (d) puede ser tanto procariota como eucariota. Preferiblemente, la célula es una célula procariota. Preferiblemente, la célula procariota es *E. coli*.

5

La bacteria *E. coli* pertenece al Superreino *Prokaryota*, Reino *Bacteria*, Phylum *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Enterobacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae* y Género *Escherichia*.

10 Existe una variedad de técnicas que se pueden utilizar para introducir un ADN en células procarióticas o eucarióticas (células hospedadoras). Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en el estado de la técnica. Por ejemplo, pero sin limitarse, para la introducción de los productos obtenidos en la etapa (d) en una célula de *E.*
15 *coli* puede emplearse el método de choque térmico, el método del cloruro cálcico, el método de Hanahan o la electroporación en bacterias previamente tratadas para ser competentes para la transformación.

Al introducir los productos de la etapa (d) en una célula, las moléculas híbridas V' de las cadenas E y G como las que se muestran en las figuras 5
20 y 7 van a ser ligadas por enzimas ligasas de la célula de manera que se van a formar construcciones génicas V' circulares unidas a través de enlaces covalentes. Dado que la nueva construcción génica V' es también un vector, porque cuenta con al menos un origen de replicación, este vector V' puede
25 replicarse en el interior celular.

En una realización preferida, el método del primer aspecto de la invención se caracteriza porque después de la etapa (e) se lleva a cabo la siguiente etapa (f):

30 f. cultivar la célula de la etapa (e).

Cuando se cultivan las células que llevan el vector circular V' formado por las cadenas E y G ligadas mediante enlaces covalentes, este vector V' va a replicarse en el interior de las células y a transmitirse de unas a otras cuando se dividan las células durante el crecimiento del cultivo. De esta forma, se
5 multiplica exponencialmente el número de moléculas de vector V' con el inserto clonado o bien con el inserto clonado y mutado, o moléculas de vector V' con una parte amplificada del vector V mutada y el inserto clonado, o el inserto clonado y mutado.

10 En una realización preferida, el método del primer aspecto de la invención se caracteriza porque después de la etapa (f) se lleva a cabo la siguiente etapa (g):

g. extraer el vector V' del cultivo de la etapa (f).

15 Para la extracción del vector V' de las células cultivadas puede emplearse cualquier técnica conocida y descrita hasta la fecha para la purificación del ADN de un vector a partir de un cultivo.

En una realización preferida, el método del primer aspecto de la invención se
20 caracteriza porque después de la etapa (g) se lleva a cabo la siguiente etapa (h):

h. comprobar la clonación o la clonación y mutación en el vector V' extraído en la etapa (g).

25 La comprobación de que la clonación ha sido eficaz puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos conocidos y descritos hasta la fecha en el estado de la técnica, como son por ejemplo, pero sin limitarse, la secuenciación, la PCR o la digestión con enzimas de restricción específicos. Preferiblemente, la comprobación inicial se realiza por PCR directa de
30 colonia y análisis del amplicón. Para la corroboración de clones positivos se hace la extracción y purificación del o de los vectores V' y a continuación la secuenciación directa de los mismos.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende las instrucciones para llevar a cabo el método para la clonación dirigida o para la clonación y mutagénesis dirigidas del primer aspecto de la invención.

Dichas instrucciones permiten que cualquiera pueda diseñar los oligonucleótidos F y R para llevar a cabo la clonación dirigida o la clonación y mutagénesis dirigidas deseadas, partiendo de una secuencia de interés y de un vector V en el que se quiere clonar dicha secuencia.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el kit además comprende un vector V. En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el kit además comprende dos oligonucleótidos cebadores de reamplificación del producto obtenido de la etapa (b) según el método del primer aspecto de la invención, uno directo y otro reverso, cuyas secuencias hibridan con la secuencia del vector V.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el kit además comprende una ADN polimerasa. Preferiblemente, la ADN polimerasa tiene actividad 3'-5' exonucleasa. Preferiblemente, la ADN polimerasa es de alta fidelidad de copia.

La introducción de residuos de desoxiadenosina en los extremos 3' no guiada por el molde, en los amplicones bicatenarios A y B, o A' y B', por el uso de una polimerasa que introduzca este tipo de residuos terminales extra, podría llevar al fracaso de la etapa (c). La etapa (c) incluye la CiPCR de clonación del inserto, y si hay un residuo 3' extra no guiado por el molde en los amplicones A y/o B, o A' y/o B', y si el residuo complementario de desoxitimidina no está presente en el sitio correspondiente de la secuencia del vector (el contiguo a la secuencia T hacia el extremo 5'), no habrá hibridación del residuo de desoxiadenosina terminal con el vector molde,

llevando al fracaso de la CiPCR. De manera similar, si la CiPCR para la obtención de los amplicones bicatenarios E y G se lleva a cabo con una polimerasa que introduce residuos de desoxiadenosina en los extremos 3', además de la limitación de estas polimerasas en la amplificación de fragmentos de ADN que superen los 3.000 pares de bases, como es el caso cuando se requiere copiar la secuencia de un vector, la introducción de este residuo no contemplado en el molde puede, además de introducir alteraciones perjudiciales en el nuevo vector V' que se genera, llevar la clonación del inserto al fracaso por una incorrecta circularización o por una falta de estabilidad por la presencia de los dos huecos correspondientes a la ausencia de los dos residuos de desoxitimidinas.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el kit además comprende la ADN endonucleasa DpnI. En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el kit además comprende células apropiadas para la introducción de un vector en ellas.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit del segundo aspecto de la invención para la clonación dirigida o para la clonación y mutagénesis dirigidas.

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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Esquema de las moléculas implicadas en las distintas etapas del método de clonación de la invención. Oligonucleótidos cebadores F y R diseñados en la etapa (a), que contienen en su extremo 3' una secuencia C_i que hibrida con la secuencia a clonar o a clonar y mutar, es decir, C_i es la secuencia de hibridación con el inserto (S-h-i), y una secuencia T que hibrida con el vector V, es decir, T es una secuencia de hibridación con el vector (S-h-V). M es la secuencia para introducir inserciones que no afectan a la secuencia del vector ni a la del inserto. Simultáneamente, se pueden añadir mutaciones M' y/o M'' en C_i y/o en T, para mutar sitios en el inserto y/o en el vector, respectivamente. Como moldes (M_o) de las etapas (b) y (c) se emplea un ADN que contenga la secuencia del inserto "i" y el vector circular de doble cadena V (cuyas dos hebras se denominan C y D), respectivamente. Las flechas en el inserto "i" y en las cadenas C y D del vector V no indican hibridación con su secuencia complementaria, sino que están localizando la secuencia a copiar directamente para incluir en el oligonucleótido correspondiente. La secuencia global del oligonucleótido F se diseña copiando directamente la secuencia señalada como C_{iF} de la hebra (5'-3') del ADN bicatenario "i", seguida desde su extremo 5' de la secuencia T_F directamente copiada de la hebra D (5'-3') del vector V. Para el oligonucleótido R se procede de la misma manera pero copiando las secuencias C_{iR} y T_R de las hebras complementarias.

Fig. 2. Esquema de elongación en la PCR clásica de la etapa (b). En la PCR de la etapa (b) se emplea como molde un ADN que contiene la secuencia del inserto "i", y se emplean los oligonucleótidos F y R cuyas secuencias C_i , o en su caso C_i mutadas, actúan de cebadores. Como producto de la PCR de la etapa (b) se obtiene un ADN lineal de doble cadena y extremos romos, constituido por las cadenas complementarias A y B del esquema. Los oligonucleótidos F y R muestran aquí la región de la hibridación inicial para el cebado de la PCR clásica. F hibrida con la cadena

3'-5' y R con la cadena 5'-3' del molde "i".

Fig. 3. Esquema de la elongación en la CiPCR de la etapa (c). En la etapa (c) se emplea como molde el vector circular de doble cadena V, cuyas dos hebras se denominan C y D. Tras la hibridación de los extremos 3' (Tc) y 5' (T) de las cadenas A y B con las cadenas C y D, la elongación tiene lugar a partir de los extremos 3', o sea, de las secuencias Tc de A y de B, respectivamente. La polimerasa elonga desde los extremos 3' (Tc) de las cadenas A y B hasta encontrarse con los extremos 5' (T) de A o B hibridados con su región complementaria en los moldes respectivos (señal de terminación de la elongación), señalada con el símbolo de parada negativo. Como resultado se generan las cadenas E y G.

Fig. 4. Esquema de los productos de la CiPCR. A. Se muestran las nuevas cadenas E y G sintetizadas en la etapa (c) lineales con sus distintas regiones y las cadenas C y D del vector V. **B.** Se muestra que las cadenas E y G no pueden servir de moldes en la etapa (c). Las secuencias cebadoras de los extremos 3' de A y B pueden hibridan con G y E, respectivamente, sin embargo, puesto que no dispone de molde, el extremo 3' Tc del cebador no se puede elongar, por lo que E y G no pueden actuar como nuevos moldes en la CiPCR y el único molde disponible son las cadenas C y D originales del vector V.

Fig. 5. Esquema de los productos de la etapa (d). La digestión de los productos de la etapa (c) con una endonucleasa dependiente de metilación conduce a la destrucción de las cadenas C y D del vector V, pero no a la de las cadenas E y G, que tras la desnaturalización y posterior enfriamiento son capaces de hibridar dando lugar al vector V' mostrado en el esquema de esta figura. Todas las regiones están identificadas y la única abertura de cada cadena se identifica con el símbolo de parada negativo.

Fig. 6. Esquema de las moléculas que se podrían generar a partir del segundo ciclo en la etapa (c). Cuando hibridan E y G, pueden iniciar la interacción de dos maneras, a través de los extremos 5' o a través de los extremos 3', representados en la figura 6A y en la figura 6B, respectivamente. En ambos casos, la segunda hibridación de los extremos lineales cohesivos complementarios llevaría a la formación del vector V' mostrado en la figura 5. Esto también puede darse por hibridación simultánea de las dos secuencias. En el caso de la molécula hibridada inicialmente a través de los extremos 3', si no se produjese la hibridación de los extremos 5' antes de que la polimerasa empezase a elongar los extremos 3' de E y G, se podrían obtener también los amplicones lineales mixtos A+V+B con extremos romos, que una vez introducidos en *E. coli*, serían degradados por ser ADN lineal.

Fig. 7. Esquema de los productos de una CiPCR de clonación y mutagénesis dirigida simultáneas. Por simplicidad se muestra una de las cadenas del vector bicatenario V' obtenido y a la derecha se indican los pasos de PCR o CiPCR y su relación con la región que se amplifica en cada paso: la PCR clásica previa permite la amplificación del inserto "i" y la introducción de las secuencias M, M' y M'' en los extremos de éste para las mutagénesis dirigidas (MD) con los oligonucleótidos F y R; la CiPCR incorpora el inserto y todas estas secuencias M, M' y M'' al nuevo vector V' simultáneamente a la amplificación de dicho vector desde el vector molde V.

Fig. 8. Productos obtenidos en la PCR, CiPCR y cultivos bacterianos en el proceso de clonación de SP1 por CiPCR. Se muestran 3 gels de agarosa en los apartados A, B y C, en los que los carriles 1, 5 y 7 corresponden al marcador de peso molecular de ADN de GeneCraft (*1kb DNA Ladder*), cuyas bandas y tamaños se muestran en detalle en el apartado D. La banda de 1.000 pares de bases es la señalada con una flecha en cada uno de los carriles 1, 5 y 7 del correspondiente gel de agarosa. **A.** Carril 2: Productos obtenidos en la PCR clásica para la

amplificación de SP1. Carril 3 Control negativo de la PCR de amplificación de SP1. **B.** Carril 4: Productos obtenidos en la CiPCR de SP1 después de tratamiento con DpnI. Carril 6: Plásmido pcDNA3-SLC16A2-EGFP usado como vector V molde en la CiPCR. **C.** Carril 8: Plásmido pcDNA3-SP1
 5 extraído y purificado de cultivos bacterianos de *E. coli* transformadas con los productos de la CiPCR de clonación de SP1 después del tratamiento con DpnI.

EJEMPLOS

10

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos CiPCR de clonación dirigida o de clonación y mutagénesis dirigidas.

15

EJEMPLO 1: Clonación de EGFP e inserción simultánea del codón de parada en el vector pcDNA3-SLC16A2 mediante CiPCR de inserción.

20

Se marcó el MCT8 (transportador 8 de monocarboxilatos) con la proteína verde fluorescente modificada, mediante clonación de su gen en el vector de expresión en eucariotas pcDNA3 (Invitrogen) conteniendo la secuencia del gen SLC16A2 (pcDNA3-SLC16A2) mediante CiPCR de inserción usando como molde el plásmido pcDNA3-SLC16A2.

25

PCR de amplificación de EGFP e inserción simultánea del codón de parada "taa".

30

La región codificadora de EGFP se amplificó usando como molde el vector plasmídico comercial pIRES2-EGFP (Clontech) mediante PCR clásica. Ésta se realizó en un volumen de 50 µl mezclando 16 µl de buffer 5x (Takara), 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM del oligonucleótido (F) 5'-**ccaaccctgaggaaccaatc-acaaccatggtgagcaa**-3' (SEQ ID NO: 1), 0,2 µM del R 5'

caatggcaagaaaggca-tta-ctgtacagctcgtccatgc-3' (SEQ ID NO: 2), en los que las secuencias resaltadas en cursiva fueron las secuencias C_i a hibridar con el inserto, y el triplete tta subrayado fue la secuencia M para la introducción del codón de parada para marcar la finalización de EGFP (la secuencias resaltadas en negrita corresponden a las regiones T de hibridación con el vector en la CiPCR posterior), 100 ng de pIRES2-EGFP y 0,5 U de polimerasa Takara (PrimeSTAR™HS DNA Polymerase). El programa de amplificación llevado a cabo en un termociclador PTC-200 (MJ Research) fue 1 ciclo a 98° C durante 40 segundos, 35 ciclos compuestos por las tres etapas: 98°C durante 10 segundos, 62°C durante 40 segundos, y 72°C durante 2 minutos, y finalmente 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos se purificaron usando el High Pure PCR Product Purification kit (Roche) y a continuación se precipitaron con acetato sódico/etanol y se disolvieron en 10 µl de agua bidestilada estéril para obtener el amplicón de 766 pares de bases conteniendo EGFP.

CiPCR de inserción de EGFP

Esta reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl mezclando 4 µl de tampón 5x (Takara), 0,2 mM dNTPs, 200 ng de pcDNA3-SLC16A2, 500 ng del amplicón de 766 pares de bases, 0,5 U de polimerasa Takara (PrimeSTAR™HS DNA Polymerase), y agua bidestilada estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 con el siguiente programa: 1 ciclo a 95° C durante 5 minutos, 7 ciclos compuestos empezando a 95°C durante 1 minuto, a 59°C durante 3 minutos, a 72°C durante 8 minutos, a 98°C durante 30 segundos, a 59°C durante 2 minutos, a 72°C durante 8 minutos, seguido de 12 ciclos compuestos a 98°C durante 20 segundos, a 85°C durante 1 minuto, y 72°C durante 8 minutos y 1 ciclo final a 72 °C durante 15 minutos. La mezcla se trató con 4 U de DpnI (Fermentas) a 37° C durante 6 horas en un volumen total de 26 µl. Después de la inactivación del enzima a 65°C durante 15 minutos, 5 µl de los productos se utilizaron para transformar 50 µl de células *E. coli* TG1. Se

sembraron e incubaron en placas de LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina, las colonias se analizaron para corroborar la presencia del un amplicón de 795 bp con los oligonucleótidos directo 5'-ctgccgggctcccccaaccctgaggaac-3' (SEQ ID NO: 3) y reverso 5'-ggccctctagagcacacaatggcaag-3' (SEQ ID NO: 4) (los clones negativos amplifican un fragmento de 69 pares de bases). Se extrajo el plásmido de una minipreparación de uno de los clones positivos y se purificó con el GeneElute Plasmid Miniprep kit (Sigma). La secuencia se verificó mediante secuenciación usando el Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit y análisis con un ABI 3730xl apparatus (Applied Biosystems). Se calculó la eficiencia de la clonación teniendo en cuenta el número de colonias obtenidas y la cantidad de plásmido usado como molde en la CiPCR, siendo dicha eficiencia de 2×10^4 colonias/µg de plásmido.

La secuencia del plásmido usado como molde pcDNA3-SLC16A2 es SEQ ID NO: 5. En SEQ ID NO: 5, las zonas entre los nucleótidos 2.564 y 2.583 y entre los nucleótidos 2.587 y 2.603, son las correspondientes secuencias de hibridación con el amplicón de EGFP.

La secuencia del plásmido obtenido pcDNA3-SLC16A2-EGFP es SEQ ID NO: 6.

EJEMPLO 2: Clonación de PCBP1 y adición simultánea de la secuencia Kozak y del codón de iniciación en una variante bioequivalente del vector pcDNA3, mediante CiPCR de sustitución.

Se clonó el gen PCBP1 en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen) mediante CiPCR, usando como molde la variante bioequivalente pcDNA3-SLC16A2-EGFP.

PCR de amplificación de PCBP1

PCBP1 se amplificó empleando como molde un plásmido-PCBP1 del que solamente se conocía la secuencia del inserto y la de las regiones flanqueantes. Estaba fusionado a etiquetas en el extremo N-terminal, por lo que hubo que incluir en el oligonucleótido directo **F** una inserción **M** 5
 5 conteniendo la secuencia Kozak y el codón de iniciación. Los oligonucleótidos F 5´-**cactatagggagacccaagct-cgcc-atg-gatgccggtgtgactg**-3´ (SEQ ID NO: 7) y R 5´- **agctcctcgcccttgctcaccat-ctagctgcaccccatg**-3´ (SEQ ID NO: 8) dan lugar a un amplicón de 1.122 pares de bases. La secuencia en negrita corresponde a la zona **T** de hibridación con el pcDNA3 en la
 10 CiPCR, la subrayada corresponde a la secuencia **M** en donde se introdujo la secuencia Kozak de PCBP1 y el ATG de iniciación, y la resaltada en cursiva corresponde a la secuencia de hibridación **C_i** con la secuencia del gen PCBP1 para su amplificación. Ésta se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 10 µl de tampón PrimeSTAR 5X, dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de
 15 cada uno de los cebadores, 50 ng de plásmido-PCBP1, 1,25 U de PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara) y agua bidestilada estéril. El programa de amplificación utilizado incluyó 1 ciclo a 94 °C durante 30 segundos; 40 ciclos compuestos empezando a 98 °C durante 10 segundos, a 60 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 75 segundos, y 1 ciclo final
 20 a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE conteniendo bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV comparándolos con el marcador de peso molecular *1 Kb Ladder* de Genecraft. Tras el corte de la banda correspondiente con una hoja de bisturí, los productos contenidos en ella se purificaron siguiendo el
 25 protocolo del kit de purificación de productos de PCR (Roche), se eluyeron en agua bidestilada estéril y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

CiPCR de PCBP1 en pcDNA3

30 La CiPCR se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de tampón PrimeSTAR 5X, dNTPs 0,2 mM, 250 ng del amplicón con la secuencia de PCBP1, de 1.122 pares de bases, 100 ng de plásmido

pcDNA3-MCT8-EGFP y 1,25 U de PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara).

5 La secuencia del plásmido usado como molde pcDNA3-SLC16A2-EGFP para clonar el gen PCBP1 es SEQ ID NO: 6. En SEQ ID NO: 6, las regiones entre los nucleótidos 873 y 893 y entre los nucleótidos 2.584 y 2.606 son las zonas del vector con las que va a hibridar el inserto para la CiPCR de PCBP1. Los nucleótidos entre las posiciones 890 y 2.583 corresponden a la secuencia del gen *SLC16A2*, que se va a sustituir por el gen PCBP1. Los
10 nucleótidos entre las posiciones 2.607 y 3.300 corresponden a la zona codificadora de EGFP.

El programa de amplificación en el termociclador PTC200 (MJ Research) consistió en 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos, 5 ciclos compuestos
15 empezando a 95 °C durante 1 minuto, a 72 °C durante 30 segundos, a 56 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 8,5 minutos, seguido de 1 ciclo a 98 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante 20 segundos, a 56 °C durante 20 segundos y a 72 °C durante 8,5 minutos, a continuación 10 ciclos compuestos empezando a 98 °C durante 20 segundos, a 81 °C durante 15
20 segundos, y a 72 °C durante 8,5 minutos; y un ciclo final a 72 °C durante 15 minutos. Tras tratamiento con DpnI durante 6 horas a 37 °C, los productos se precipitaron con acetato sódico / etanol y se transformaron células *E. coli* TG1. Siguiendo el protocolo habitual se obtuvo el plásmido pcDNA3-PCBP1, con una eficiencia de 180 colonias/μg de plásmido, calculada a partir de la
25 cantidad del plásmido usado como molde.

La secuencia del plásmido pcDNA3-PCBP1 es SEQ ID NO: 9. En SEQ ID NO: 9, las regiones entre los nucleótidos 873 y 893 y entre los nucleótidos 1.969 y 1.991 son las secuencias donde hibridaron las secuencias **Tc** del inserto. Las regiones entre los nucleótidos 901 y 916 y entre los nucleótidos
30 1.953 y 1.968 son las secuencias **C_i** de hibridación de los cebadores con el molde (plásmido-PCBP1) para obtener el amplicón a insertar. La región

entre los nucleótidos 894 y 900 fue introducida en el cebador para aportar la secuencia Kozak original de PCBP1 y el ATG o codón de iniciación y corresponde a una secuencia de la región **M** del oligonucleótido **F**. El codón TAG entre los nucleótidos 1966 y 1968, en la zona del cebador inverso, es el
 5 codón de parada que se introdujo para evitar la expresión de PCBP1 (cuya secuencia codificadora se encuentra entre los nucleótidos 898 y 1.965) fusionado con EGFP (cuya secuencia codificadora se encuentra entre los nucleótidos 1.992 y 2.685).

10 **EJEMPLO 3: Clonación de SP1 en una variante bioequivalente del vector pcDNA3, mediante CiPCR de sustitución.**

La figura 8 ilustra este ejemplo.

15 Se clonó el gen SP1 en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen Cat. V790-20) mediante CiPCR, usando como molde la variante bioequivalente pcDNA3-SLC16A2-EGFP

PCR de amplificación de SP1

20

La región codificadora de SP1 comprende 2.358 pares de bases (incluyendo el codón de iniciación ATG y el de parada TGA). El fragmento se amplificó de un ADNc obtenido por retrotranscripción con la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen) a partir de ARNm de linfocitos de sangre extraído mediante
 25 Trizol (Invitrogen) con los cebadores F 5'- **cactatagggagaccaagc-ccaccatgagcgaccaagatcactccat-3'** (SEQ ID NO: 10), y R 5'- **agctcctcgcccttgctcaccat-tcagaagccattgccact-3'** (SEQ ID NO: 11) donde la secuencia en cursiva hibridó con el cDNA de SP1, según la secuencia del transcrito SP1-201 ENST00000327443 de la base de datos Ensembl. Los
 30 nucleótidos resaltados en negrita fueron las secuencias **T** añadidas a los oligonucleótidos cebadores para su posterior clonación en pcDNA3. La PCR se realizó en un volumen total de 50 µl que contenía 10 µl de tampón

PrimeSTAR 5X, dNTPs 0,2 mM, 0,2 μ M de cada cebador, 1 μ l de disolución
 conteniendo el ADNc equivalente a la retrotranscripción de 50 ng del ARNm
 de los linfocitos, y 1,25 U de PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara), en el
 termociclador PTC-200 se amplificó el fragmento usando el programa
 5 siguiente: 1 ciclo a 94°C durante 30 segundos; 40 ciclos compuestos
 empezando a 98°C durante 10 segundos, a 59°C durante 30 segundos, y a
 72°C durante 2,5 minutos, y 1 ciclo final de extensión a 72°C durante 10
 10 minutos, obteniéndose un amplicón de 2.406 pares de bases. En todas las
 reacciones se usó como diluyente agua bidestilada estéril. Los productos de
 PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa del 1%, se tiñeron
 con bromuro de etidio (0,5 μ l/ml en TAE) y se visualizaron con luz UV. Como
 marcador de peso molecular se utilizó Genecraft 1 Kb. Los productos de la
 banda de peso molecular esperado se cortaron con una hoja de bisturí y se
 purificaron siguiendo el protocolo del kit de purificación de productos de PCR
 15 desde geles de agarosa de Roche.

Clonación del amplicón de 2.406 pares de bases conteniendo SP1 en pCRII
 TOPO (Invitrogen)

20 Los productos se eluyeron en agua bidestilada estéril y tras adenilación se
 clonaron en el vector pCRII TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones
 del proveedor.

Amplificación de SP1 usando el pCRII TOPO-SP1 como molde

25 La región codificadora de SP1 de 2.358 pares de bases se amplificó del
 plásmido pCRII TOPO-SP1 con los mismos oligonucleótidos F (SEQ ID NO:
 10) y R (SEQ ID NO: 11) con los que se clonó. Una mezcla de reacción de
 50 μ l, conteniendo 10 μ l de tampón PrimeSTAR 5X, 0,2 mM de dNTPs, 0,2
 30 μ M de cada oligonucleótido, 50 ng de pCR II TOPO-SP1, 1 U de polimerasa
 PrimeSTAR HS DNA (Takara) y agua bidestilada estéril, se cargó en el
 termociclador (PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa: 1 ciclo a

94 °C durante 30 segundos; 40 ciclos compuestos, empezando a 98°C durante 10 segundos, a 59 °C durante 30 segundos, y a 72°C durante 2,5 minutos, y 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1%, y se purificaron del gel usando el High Pure PCR Product Purification kit (Roche), a continuación se precipitaron en acetato sódico/etanol y se disolvieron en 10 µl de agua bidestilada estéril.

CiPCR de SP1 en pcDNA3

10 La CiPCR se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de tampón PrimeSTAR 5X, dNTPs 0,3 µM de cada uno, 250 ng del amplicón de SP1, 100 ng de plásmido pcDNA3-SLC16A2-EGFP y 1,25 U de PrimeSTAR HS DNA polimerasa (Takara N° Cat. R010Q), en el termociclador PTC-200 con el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, 15 5 ciclos compuestos empezando a 95°C durante 1 minuto, a 71°C durante 30 segundos, a 60°C durante 30 segundos, a 56°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 8,5 minutos, un nuevo ciclo compuesto a 98°C durante 30 segundos, a 71°C durante 20 segundos, a 60°C durante 20 segundos, a 56°C durante 20 segundos y a 72°C durante 8,5 minutos, seguido por 10 20 ciclos compuestos, a 98°C durante 20 segundos, a 78°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 8,5 minutos; y 1 ciclo final a 72°C durante 15 minutos.

Los productos de la CiPCR se trataron con DpnI durante 6 horas a 37°C, se precipitaron y se transformaron en *E. coli* TG-1. Tras crecimiento de colonias y análisis se obtuvo el plásmido pcDNA3-SP1 esperado, con una eficiencia de 40 colonias/µg plásmido, calculado a partir de la cantidad de plásmido usado como molde en la CiPCR.

La secuencia del plásmido pcDNA3-SP1 es SEQ ID NO: 12.

REIVINDICACIONES

1. Un método de clonación dirigida o de clonación y mutagénesis dirigidas caracterizado porque comprende una primera etapa (a):
- 5
- a. diseñar una pareja de oligonucleótidos F (directo) y R (reverso) donde:
- i. las secuencias de los extremos 3' (C_i) hibridan total o parcialmente con la secuencia a clonar o a clonar y mutar,
- 10
- ii. las secuencias de los extremos 5' (T) hibridan total o parcialmente con las secuencias de un vector V que flanquean el lugar donde se va a insertar el ADN a clonar o a clonar y mutar, y
- 15
- iii. el vector V es un vector bicatenario preferentemente circular que comprende al menos un origen de replicación y preferentemente al menos un gen de selección.
- 20
2. El método según la reivindicación 1 caracterizado porque los oligonucleótidos F y/o R comprenden una mutación M de tipo inserción entre la secuencia C_i y la secuencia T, donde M comprende al menos un nucleótido y no hibrida con la secuencia a clonar o a clonar y mutar, ni con el vector V.
- 25
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 caracterizado porque los oligonucleótidos F y/o R comprenden al menos una mutación M' en C_i, donde la mutación puede ser una inserción, una sustitución o una deleción y no hibrida con la secuencia
- 30
- a clonar o a clonar y mutar, ni con el vector V.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3
caracterizado porque los oligonucleótidos F y/o R comprenden al
menos una mutación M' en T, donde la mutación puede ser una
inserción, una sustitución o una deleción y no hibrida con la secuencia
a clonar o a clonar y mutar, ni con el vector V.
- 5
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4
caracterizado porque después de la etapa (a) se lleva a cabo la
siguiente etapa (b):
- 10 b. Amplificar mediante PCR la secuencia a clonar o a clonar y
mutar empleando los oligonucleótidos F y R diseñados en la
etapa (a).
6. El método según la reivindicación 5 caracterizado porque en la PCR
se emplea una ADN polimerasa con actividad 3'-5' exonucleasa.
- 15
7. El método según la reivindicación 6 caracterizado porque después de
la etapa (b) se lleva a cabo la siguiente etapa (c):
- c. Clonar la secuencia amplificada en la etapa (b) en el vector V
mediante una PCR inversa de clonación (CiPCR).
- 20
8. El método según la reivindicación 7 caracterizado porque después de
la etapa (c) se lleva a cabo la siguiente etapa (d):
- d. Digerir el producto de la etapa (c) con una ADN
endonucleasa dependiente de metilación.
- 25
9. El método según la reivindicación 8 caracterizado porque la ADN
endonucleasa dependiente de metilación es DpnI.
- 30
10. El método según la reivindicación 9 caracterizado porque después de
la etapa (d) se lleva a cabo la siguiente etapa (e):
- e. Introducir los productos de la etapa (d) en una célula.

11. El método según la reivindicación 10 caracterizado porque la célula es una célula procariota.
- 5 12. El método según la reivindicación 11 caracterizado porque la célula procariota es *Escherichia coli*.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 caracterizado porque después de la etapa (e) se lleva a cabo la siguiente etapa (f):
- 10 f. cultivar la célula de la etapa (e).
14. El método según la reivindicación 13 caracterizado porque después de la etapa (f) se lleva a cabo la siguiente etapa (g):
- 15 g. extraer el vector V' del cultivo de la etapa (f).
15. El método según la reivindicación 14 caracterizado porque después de la etapa (g) se lleva a cabo la siguiente etapa (h):
- 20 h. comprobar la clonación o la clonación y mutación en el vector V' extraído en la etapa (g).
16. Un kit que comprende dos oligonucleótidos cebadores de reamplificación del producto obtenido de la etapa (b) según el método descrito en la reivindicación 6, uno directo y otro reverso, cuyas secuencias hibridan con la secuencia del vector V.
- 25
17. El kit según la reivindicación 16 que además comprende un vector V.
- 30 18. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17 que además comprende una ADN polimerasa.

19. El kit según la reivindicación 18 donde la ADN polimerasa tiene actividad 3'-5' exonucleasa.
- 5 20. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 que además comprende la ADN endonucleasa DpnI.
21. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 que además comprende células apropiadas para la introducción de un vector.
- 10 22. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 para la clonación dirigida o para la clonación y mutagénesis dirigidas.

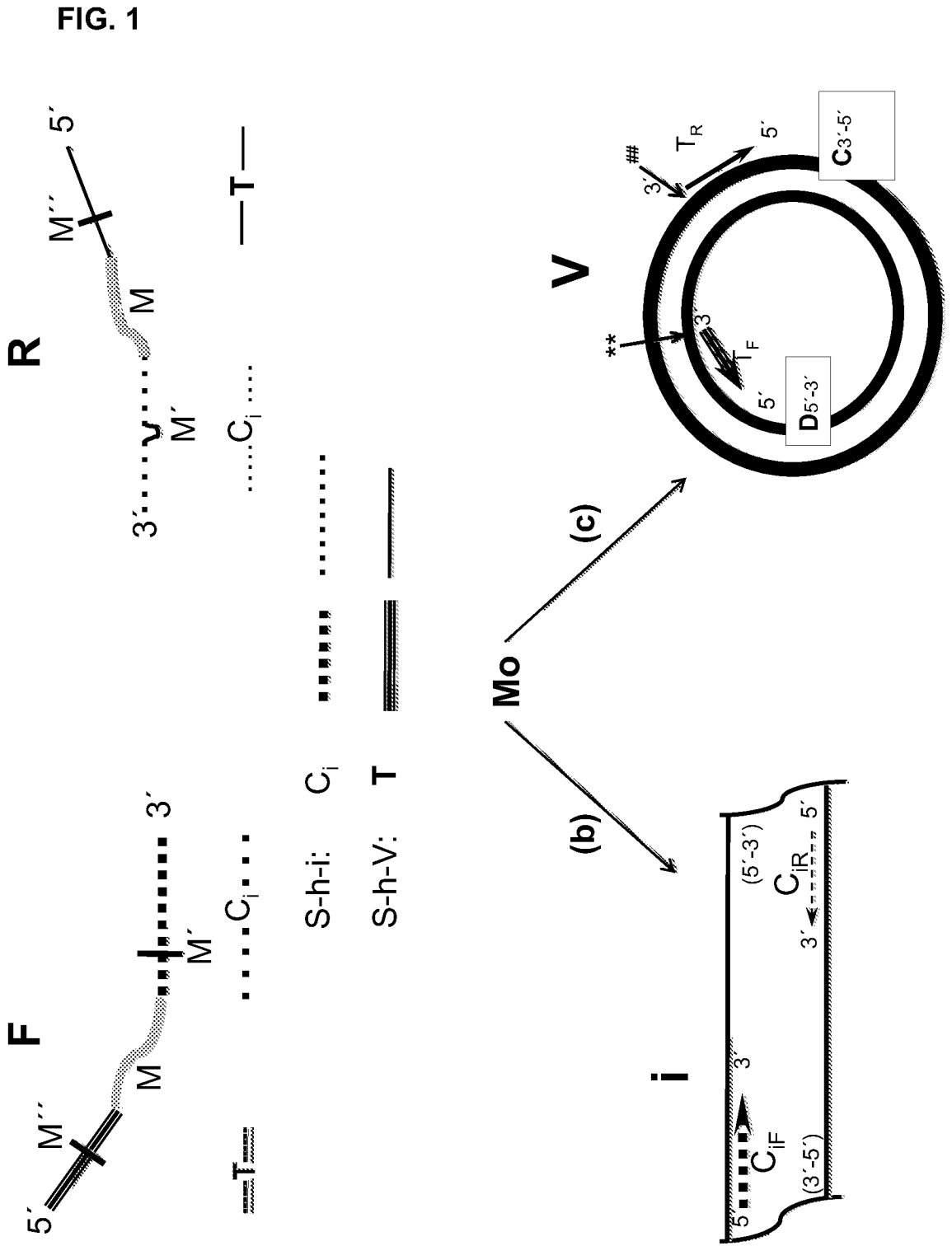


FIG. 2

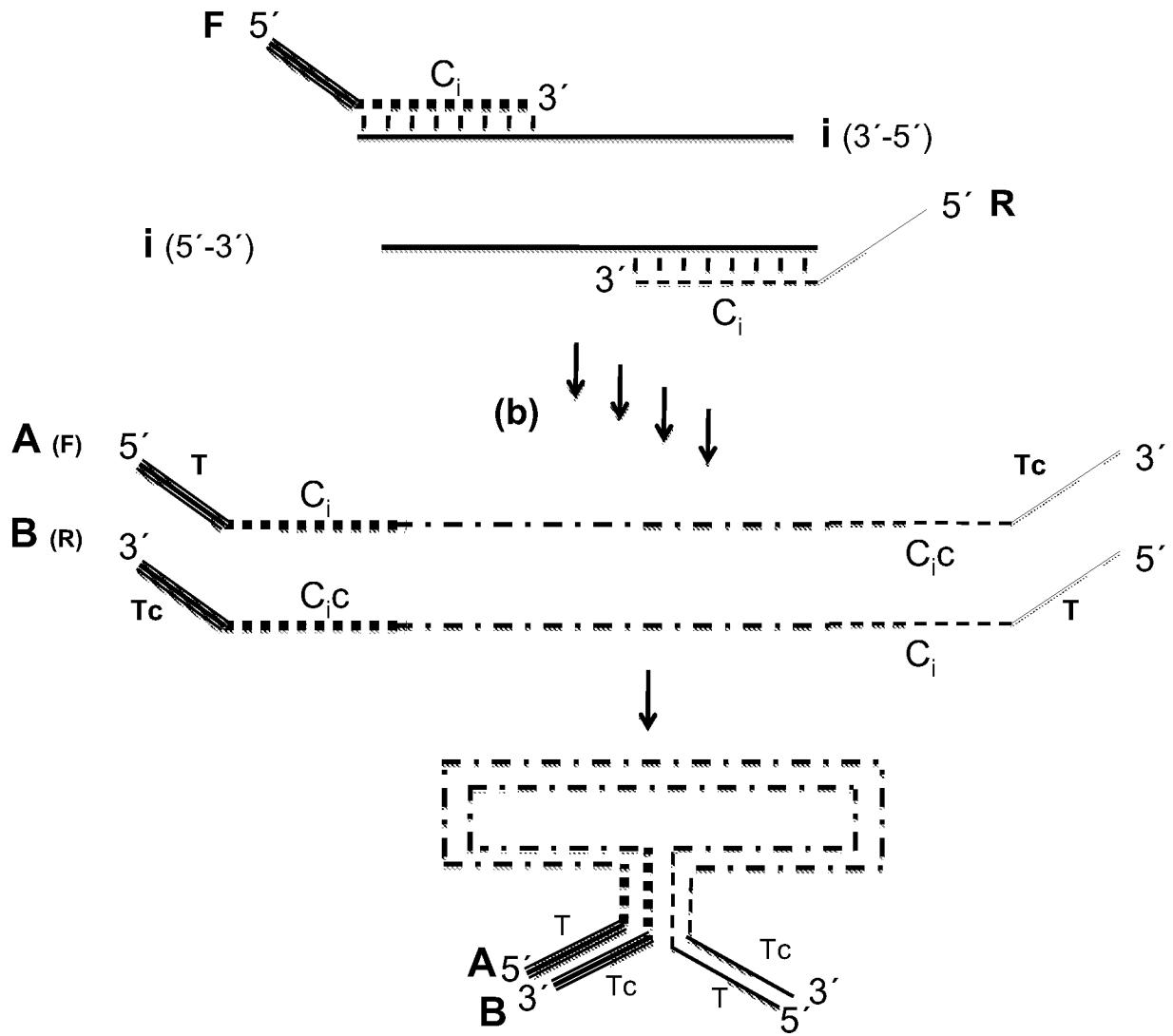


FIG. 3

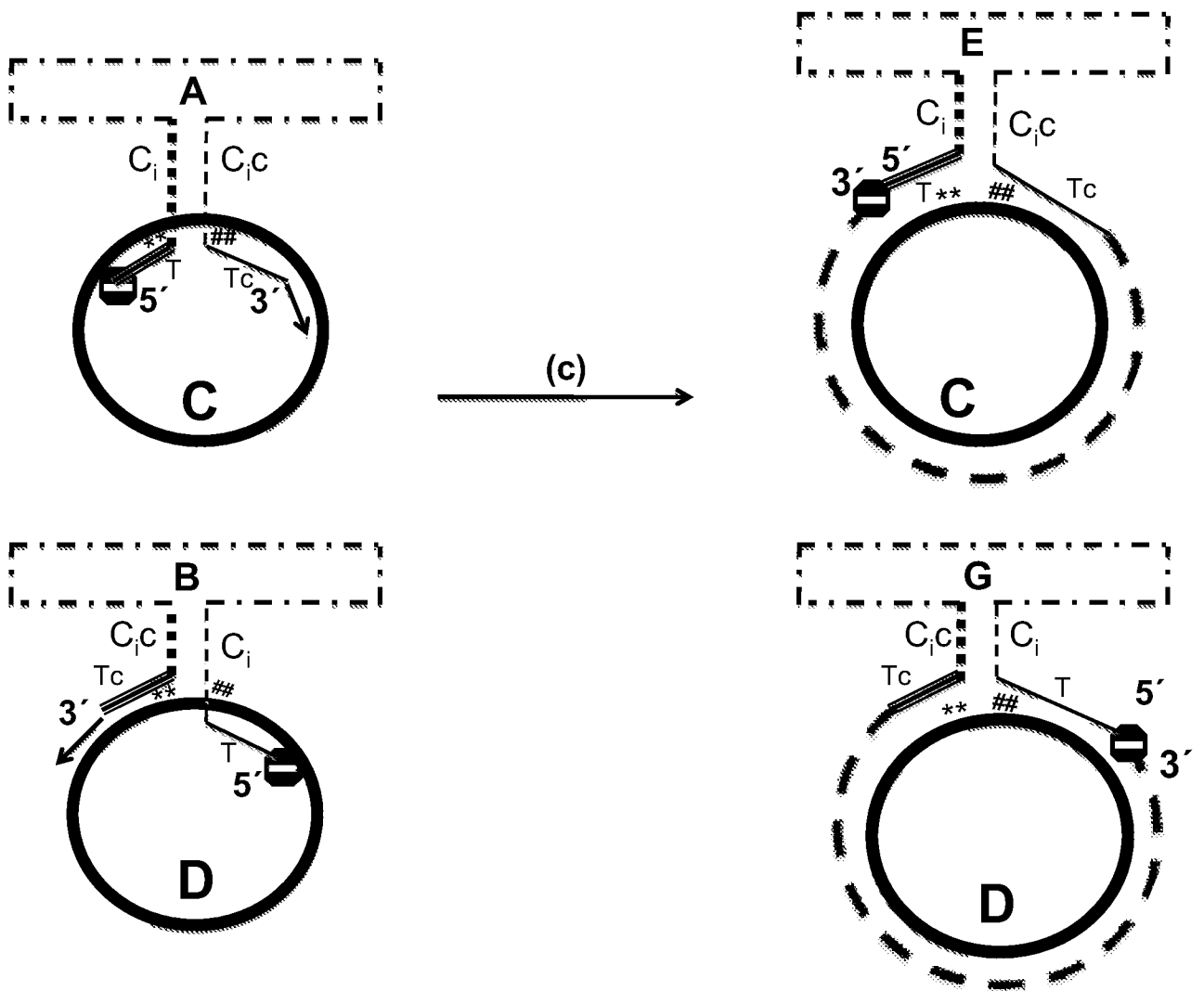


FIG. 4A

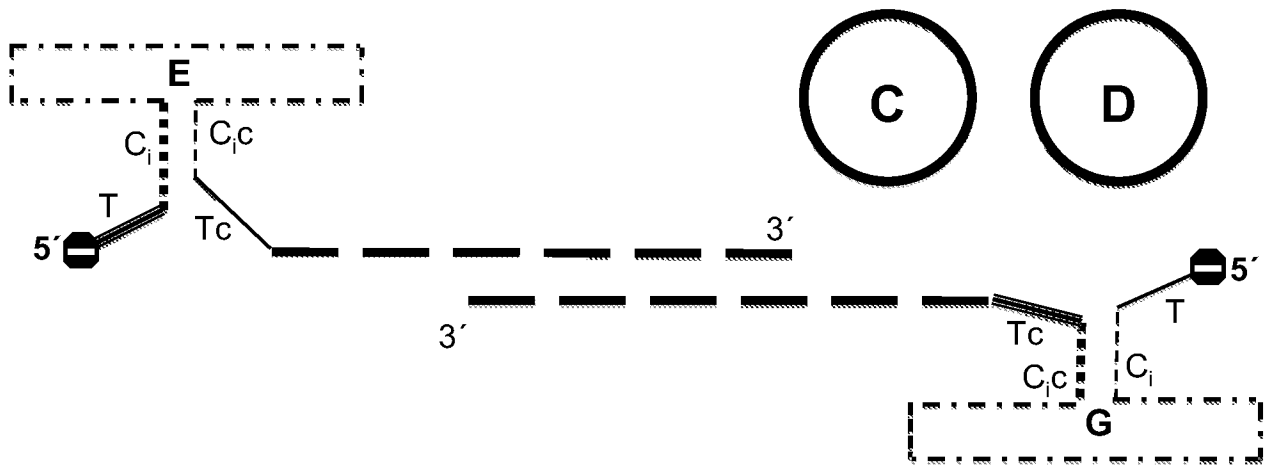


FIG. 4B

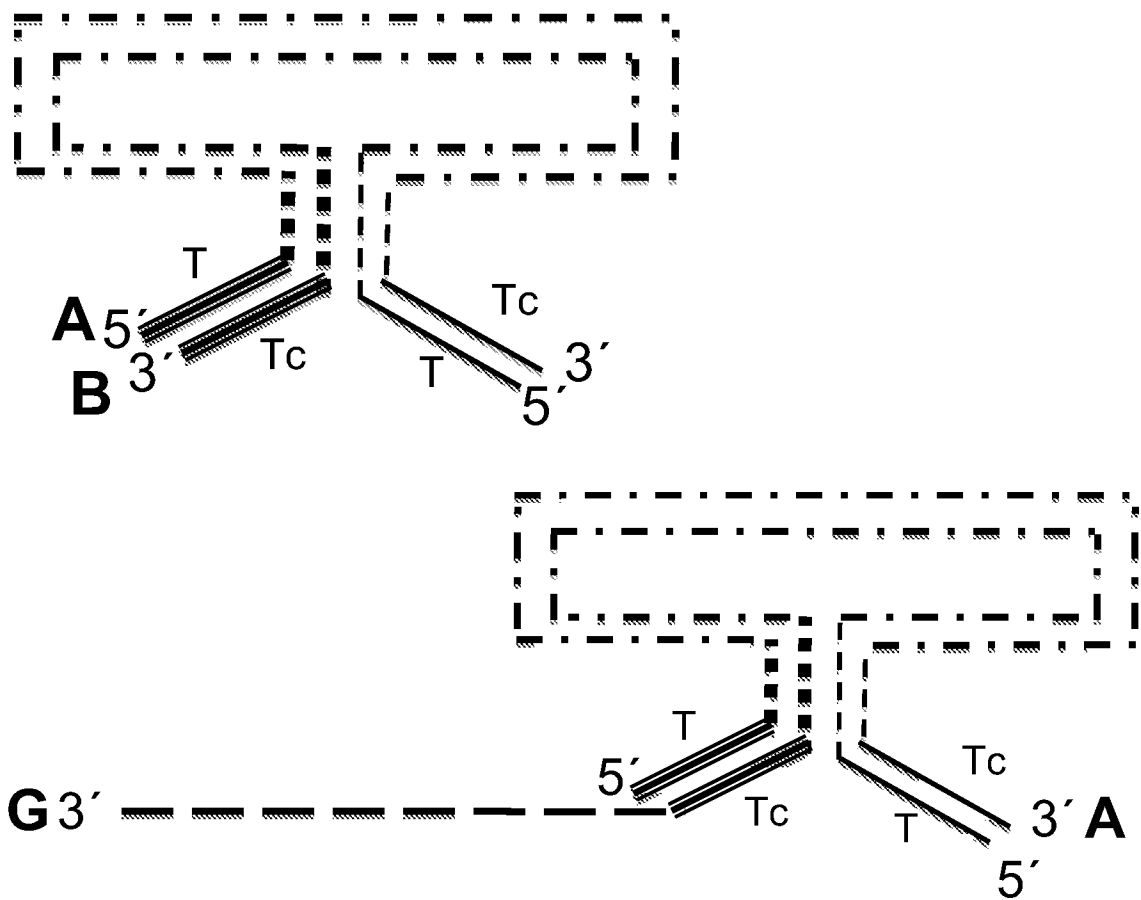


FIG. 5

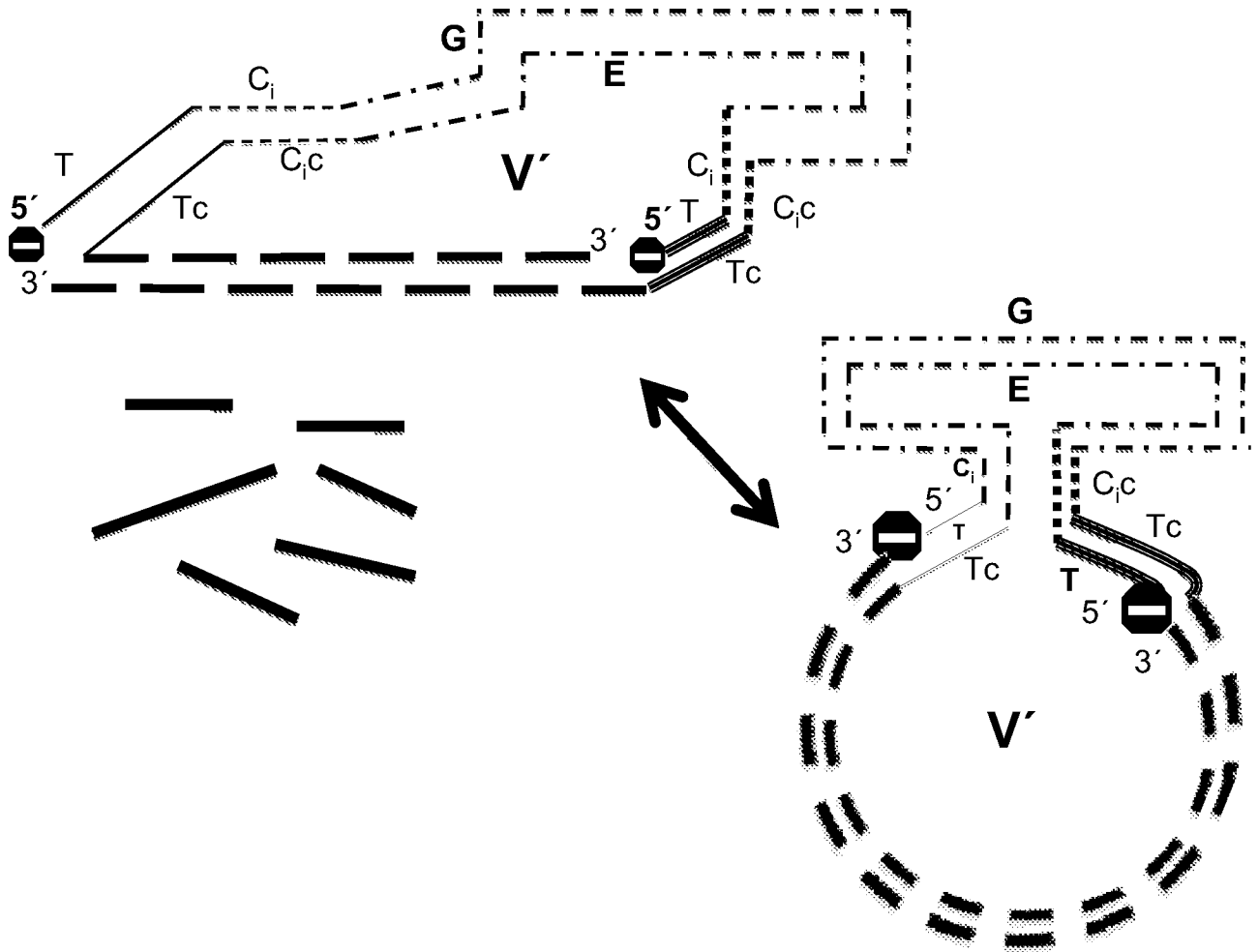


FIG. 6A

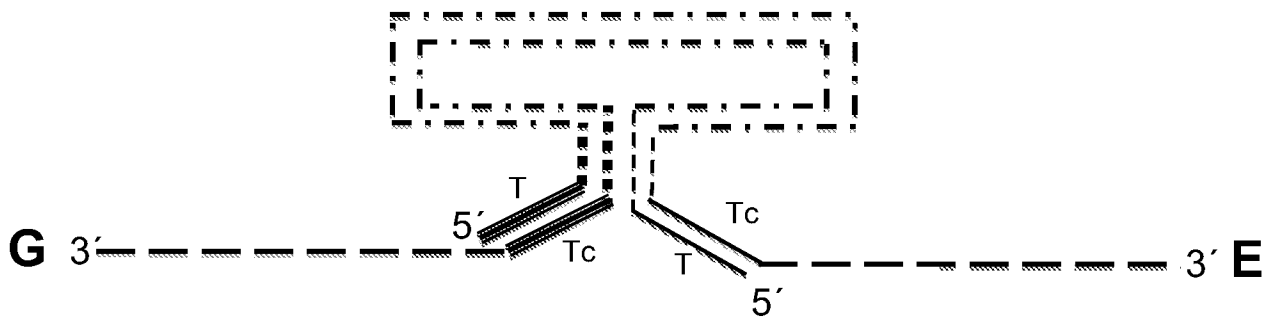


FIG. 6B

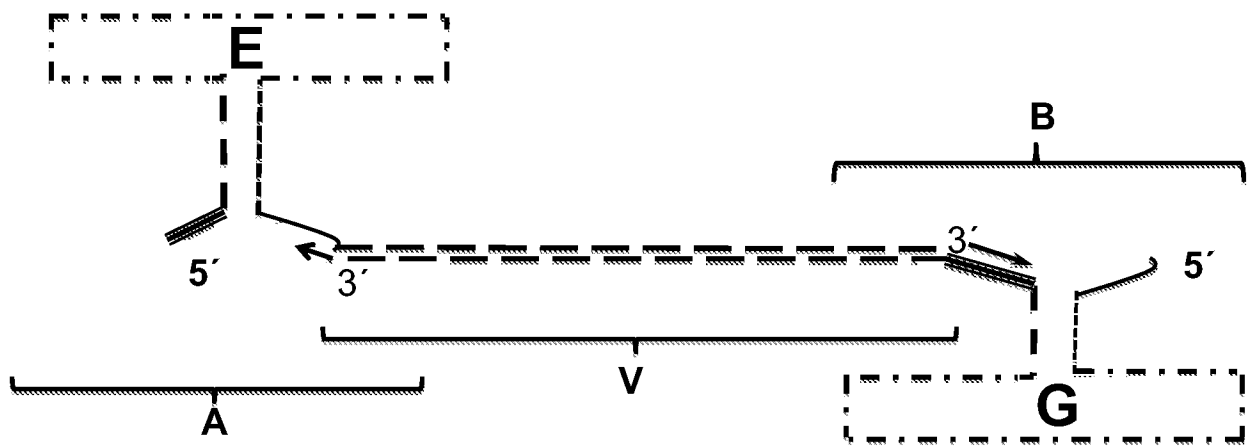


FIG. 7

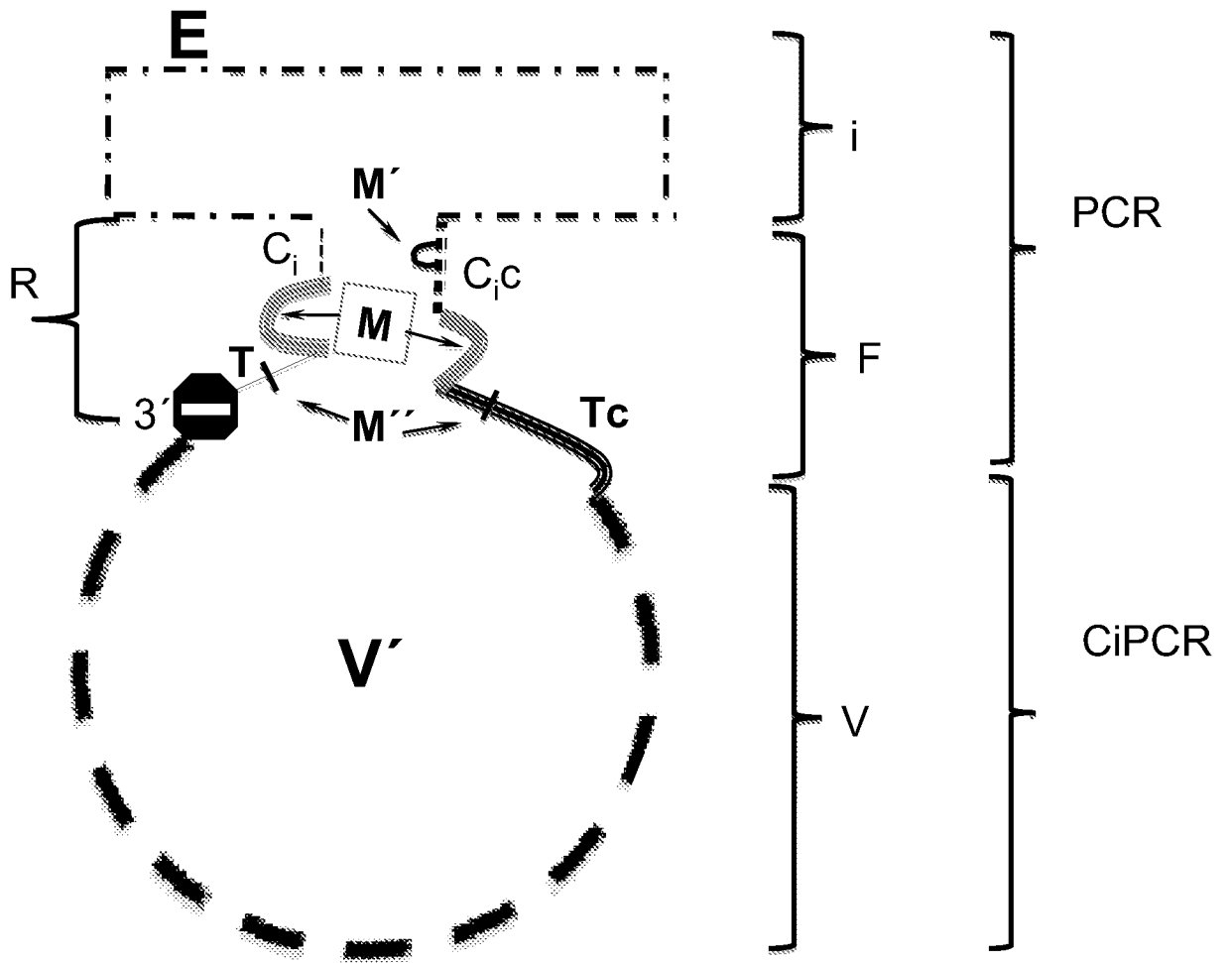
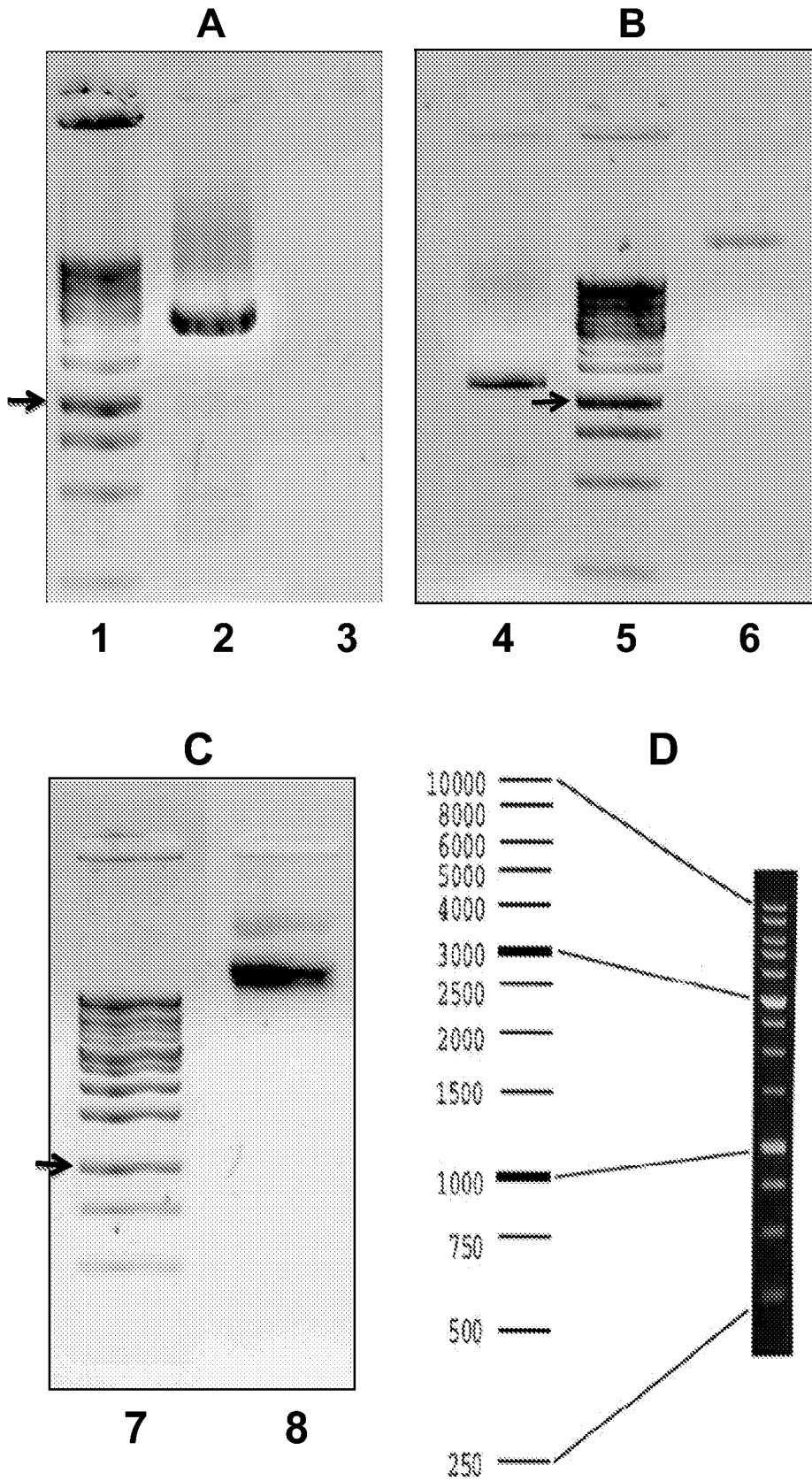


FIG. 8



ES 2 387 167 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Santiago de Compostela
- <120> Nuevo método de clonación y mutagénesis in vitro mediante PCR inversa de clonación
- <130> ES1596.30bis
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Cebador F para la clonación de EGFP en pcDNA3
- <400> 1
ccaaccctga ggaaccaatc acaaccatgg tgagcaa 37
- <210> 2
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Cebador R para la clonación de EGFP en pcDNA3
- <400> 2
caatggcaag aaaggcatta cttgtacagc tcgtccatgc 40
- <210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Cebador F para comprobar la clonación de EGFP
- <400> 3
ctgccgggct cccccaacc tgaggaac 28
- <210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Cebador R para comprobar la clonación de EGFP
- <400> 4
ggccctctag agcacacaat ggcaag 26
- <210> 5
<211> 7072
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Plásmido pcDNA3-SLC16A2

ES 2 387 167 A1

<400> 5
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgtg acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctttgcagc 900
agcagaaaca agtaccagcc acaaagcggc tcctctggcc caagcagcca cagtcccccc 960
gccgcatgg cgctgcaaag ccaggcgagc gaggaagcaa aggggccctg gcaggaggca 1020
gaccaggaac agcaggagcc ggtgggtagc ccagagccgg agtctgagcc ggagcctgag 1080
cccagccccg agcccgtgcc agtgccccg cccgagcccc agccggagcc ccagccccta 1140
ccggaccccc caccctgcc ggagctggag ttcgagtccg agcgggtgca cgaaccgag 1200
cccacgccta cggtagagac ccgcgccacc gcgcgcggct tccagcctcc cgaaggtggc 1260
ttcggctggg tgggtggtgt cgctgccacc tggtgcaac gctccatctt cggcatccat 1320
aactctgtcg ggatcctcta ctcatgctg ctagaggagg aaaaggaaaa aaatcgccaa 1380
gtggagtcc aagcagcatg ggtcggagcc ctgcgatgg gtatgatctt cttctgttct 1440
cccattgtga gtatattcac tgaccgtttg ggctgccgaa tcacagcaac cgcgggggct 1500
gccgttgctt tcattggcct cataccagc tccttcacca gctccctaag cctgcgctac 1560
ttcacctacg ggattctctt tggttgtggc tgttccttcg cctttcagcc atccctcgtc 1620
atcctgggcc actactttca acgccgctg ggtctggcca atgggtgtgg gtctgctggg 1680
agtagcattt tctcatgtc cttcccctc ctcatcagaa tgctggggga taagatcaag 1740
ctggcccaaa cttccaggt gctgagtacc ttcattgttg ttcttatgct gctttcactc 1800
acctaccggc cctcctgcc cagctcccag gacacccaa gcaagagagg tgtccgcacc 1860
ctgcaccagc gctttctggc tcagctcagg aagtacttca acatgagag gttccgccaa 1920
cgcacttacc gcatctgggc cttcgaatt gctgctgctg cccttggcta ctttgttccc 1980

ES 2 387 167 A1

tatgtacacc	tgatgaagta	tgtggaggag	gagttctcag	aatcaagga	gacctgggtg	2040
ctcttggtgt	gtattggggc	tacctcaggc	cttgggcgtc	ttgtgtcagg	ccacatcagt	2100
gactccatcc	ctggacttaa	gaagatctac	ttgcagggtcc	tttccttcct	gctcctgggc	2160
ctgatgtcca	tgatgattcc	cctgtgccgg	gacttcgggg	gccttatcgt	cgtctgtcct	2220
ttcctggggc	tttgcatgg	cttcttcac	accatcatgg	ccccattgc	atctgagctg	2280
gtgggccc	tgaggcctc	acaggccatt	ggctacctcc	tgggcatgat	ggccctgcc	2340
atgattgctg	ggcccccat	tgaggccta	ctccgcaact	gttttgggga	ctaccatgtg	2400
gccttctact	ttgccggtgt	ggcccccatc	atcggggctg	taatcctctt	cttcgtccct	2460
ctgatgcac	aaaggatgtt	caagaaagag	cagagagatt	ccagcaagga	taagatgttg	2520
ggccctgacc	cagacccca	tggggagcta	ctgccgggct	cccccaacc	tgaggaacca	2580
atctaata	gtccctgcca	ttgtgtgctc	tagagggccc	tattctatag	tgacaccta	2640
atgctagagc	tcgctgatca	gcctcgactg	tgcttcttag	ttgccagcca	tctgttgttt	2700
ggccctcccc	cgtgccttc	ttgaccctgg	aagggtccac	tcccactgtc	ctttcctaat	2760
aaaatgagga	aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	ttctattctg	gggggtgggg	2820
tggggcagga	cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	ggggatgctg	2880
tgggctctat	ggcttctgag	gcggaagaa	ccagctgggg	ctctaggggg	tatccccacg	2940
cgccctgtag	cgccgcatca	agcgcggcgg	gtgtgggtgt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	3000
cacttgccag	cgccctagcg	cccgtcctt	tcgcttctt	cccttcctt	ctcgccacgt	3060
tcgccggctt	tccccgtaa	gctctaaatc	ggggcatccc	tttagggttc	cgatttagtg	3120
ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	tggttcacgt	agtgggcat	3180
cgccctgata	gacggttttt	cgcccttga	cgttggagtc	cacgttctt	aatagtgac	3240
tcttgtcca	aactggaaca	aaactcaacc	ctatctcgg	ctattctt	gatttataag	3300
ggattttggg	gatttcggcc	tattgggtta	aaaatgagct	gatttaaca	aaatttaacg	3360
cgaattaatt	ctgtggaatg	tggtgtcagtt	aggggtgtga	aagtccccag	gctccccagg	3420
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccagggtg	ggaaagtccc	3480
caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaa	gcatgcatct	caattagtc	gcaaccatag	3540
tcccggccc	aactccgccc	atcccggccc	taactccgccc	cagttccgccc	cattctccgc	3600
cccatggctg	actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	ggccgcctct	gcctctgagc	3660
tattccagaa	gtagtgagga	ggctttttt	gaggcctagg	cttttgcaa	aaagctcccg	3720
gagcttgtat	atccattttc	ggatctgatc	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	3780
ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	cgccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	3840
atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	ctgatccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	3900
aggggcgccc	ggttctttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	3960
acgaggcagc	gcggctatcg	tggctggcca	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	4020

ES 2 387 167 A1

acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 4080
 tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 4140
 ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg 4200
 agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 4260
 atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 4320
 aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 4380
 gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 4440
 cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 4500
 tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg 4560
 agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 4620
 atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 4680
 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccca 4740
 cccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatth 4800
 cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt 4860
 atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat catggtcata 4920
 gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacacatac gagccggaag 4980
 cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgctgtgag 5040
 ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca 5100
 acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc 5160
 gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg 5220
 gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 5280
 ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga 5340
 cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag 5400
 ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct 5460
 taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg 5520
 ctgtaggtat ctcaattcgg ttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 5580
 ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 5640
 aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 5700
 tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac 5760
 agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 5820
 ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat 5880
 tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc 5940
 tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt 6000
 cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta 6060

ES 2 387 167 A1

aacttggctct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct 6120
 atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg 6180
 cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga 6240
 tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt 6300
 atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt 6360
 taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgtcgtt 6420
 tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat 6480
 gttgtgcaaa aaagcggta gtccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc 6540
 cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc 6600
 cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat 6660
 gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcg cacaatagcag 6720
 aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt 6780
 accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc 6840
 ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa 6900
 ggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcatactc ttcctttttc aatattattg 6960
 aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa 7020
 taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tc 7072

<210> 6
 <211> 7789
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pcDNA3-SLC16A2-EGFP

<400> 6
 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720

ES 2 387 167 A1

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtg acaactccgc cccattgacg caaatggggcg 780
 gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccga 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctttgcagc 900
 agcagaaaca agtaccagcc acaaagcggc tcctctggcc caagcagcca cagtcccccc 960
 gccgcgatgg cgctgcaaag ccaggcgagc gaggaagcaa agggggccctg gcaggaggca 1020
 gaccaggaac agcaggagcc ggtgggtagc ccagagccgg agtctgagcc ggagcctgag 1080
 cccgagcccc agccccgtgc agtgcccccg cccgagcccc agccggagcc ccagccccta 1140
 ccggaccccc caccctgccc ggagctggag ttcgagtccg agcgggtgca cgaacccgag 1200
 cccacgccta cggtagagac ccgcggcacc gcgcgcggct tccagcctcc cgaaggtggc 1260
 ttcggctggg tgggtggtgt cgctgccacc tggtgcaacg gctccatctt cggcatccat 1320
 aactctgtcg ggatcctcta ctccatgctg ctagaggagg aaaaggaaaa aaatcgccaa 1380
 gtggagtcc aagcagcatg ggtcggagcc ctgcgatgg gtatgatctt cttctgttct 1440
 cccattgtga gtatattcac tgaccgtttg ggctgccgaa tcacagcaac cgcgggggct 1500
 gccgttgctt tcattggcct cataccagc tccttcacca gctccctaag cctgcgctac 1560
 ttcacctacg ggattctctt tggttgtggc tgttccttcg cttttcagcc atccctcgtc 1620
 atcctgggcc actactttca acgccgctg ggtctggcca atggtgtggt gtctgctggg 1680
 agtagcattt tctccatgct cttccccttc ctcatcagaa tgctggggga taagatcaag 1740
 ctggcccaaa cttccaggt gctgagtacc ttcattgttg ttcttatgct gctttcactc 1800
 acctaccggc cctcctgccc cagctcccag gacacccca gcaagagagg tgtccgcacc 1860
 ctgcaccagc gctttctggc tcagctcagg aagtacttca acatgcgagt gttccgcaaa 1920
 cgcacttacc gcatctgggc cttcggaaat gctgctgctg cccttggcta ctttgttccc 1980
 tatgtacacc tgatgaagta tgtggaggag gagttctcag aaatcaagga gacctgggtg 2040
 ctcttggtgt gtattggggc tacctcaggc cttgggcgct ttgtgtcagg ccacatcagt 2100
 gactccatcc ctggacttaa gaagatctac ttgcaggctc tttccttctt gtcctggggc 2160
 ctgatgtcca tgatgattcc cctgtgccgg gacttcgggg gccttatcgt cgtctgtctt 2220
 ttctggggc tttgcgatgg cttcttcac accatcatgg ccccatcgc atttgagctg 2280
 gtgggcccga tgcaggcctc acaggccatt ggctacctcc tgggcatgat ggccctgcca 2340
 atgattgctg ggcccccat tgcaggccta ctccgcaact gttttgggga ctaccatgtg 2400
 gccttctact ttgccggtgt gcccccatc atcggggctg taatcctctt cttcgtcctt 2460
 ctgatgcac aaaggatggt caagaaagag cagagagatt ccagcaagga taagatggtg 2520
 gccctgacc cagacccca tggggagcta ctgccgggct ccccaacc tgaggaacca 2580
 atcatggtga gcaagggcga ggagctgttc accgggggtg tgccatcct ggtcgagctg 2640
 gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc 2700
 tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccctggccc 2760

ES 2 387 167 A1

accctcgtga ccaccctgac ctacggcgtg cagtgcctca gccgctaccc cgaccacatg 2820
 aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc 2880
 ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc 2940
 ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg 3000
 cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag 3060
 aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc 3120
 gccgaccact accagcagaa caccctcatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac 3180
 cactacctga gcaccagtc cgccctgagc aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg 3240
 gtctgtctgg agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag 3300
 taatgccttt cttgccattg tgtgctctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg 3360
 ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagtgg ccagccatct gttgtttgcc 3420
 cctccccctg gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa 3480
 atgaggaaat tgcatcgcac tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg 3540
 ggaggagcag caaggggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgagggtg 3600
 gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc taggggggtat ccccacgcgc 3660
 cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 3720
 ttgccagcgc cctagcggcc gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg 3780
 ccggccttcc ccgtcaagct ctaaactcggg gcatcccttt agggttccga tttagtgcct 3840
 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatg ttcacgtagt gggccatcgc 3900
 cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 3960
 tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggctca ttcttttgat ttataagggg 4020
 ttttggggat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 4080
 attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct ccccaggcag 4140
 gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag 4200
 gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accatagtcc 4260
 cgcccctaac tccgcccac cgcgccctaa ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc 4320
 atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat 4380
 tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag 4440
 cttgtatata cattttcgga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg 4500
 aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 4560
 actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 4620
 ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc tgtccggctg cctgaatgaa ctgcaggacg 4680
 aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgvcagct gtgctcgacg 4740
 ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 4800

ES 2 387 167 A1

tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 4860
 tgcatacgct tgatccggct acctgccccat tcgaccacca agcgaacat cgcatacgagc 4920
 gagcacgtac tcggatggaa gccggctcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 4980
 aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcggag 5040
 atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 5100
 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 5160
 tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 5220
 tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt 5280
 tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 5340
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 5400
 ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 5460
 caacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 5520
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 5580
 ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct 5640
 gtttctctgt tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat 5700
 aaagtgtaaa gcctgggggt cctaagagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc 5760
 actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg 5820
 cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgtc 5880
 gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt 5940
 atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 6000
 caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga 6060
 gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 6120
 ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac 6180
 cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg 6240
 taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 6300
 cgttcagccc gaccgctgcg cttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttag 6360
 acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatagt 6420
 aggcggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 6480
 atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg 6540
 atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac 6600
 gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca 6660
 gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 6720
 ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 6780
 ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt 6840

ES 2 387 167 A1

tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct 6900
 accatctggc cccagtgcct caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagatct 6960
 atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctcctg caactttatc 7020
 cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa 7080
 tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg 7140
 tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatggt 7200
 gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc 7260
 agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt 7320
 aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg 7380
 gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac 7440
 tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc 7500
 gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt 7560
 tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg 7620
 aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 7680
 catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 7740
 acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtc 7789

<210> 7
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador F para la clonación y mutagénesis de PCBP1 en pcDNA3

<400> 7
 cactataggg agaccaagc tcgcatgga tgccggtgtg actg 44

<210> 8
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador R para la clonación y mutagénesis de PCBP1 en pcDNA3

<400> 8
 agctcctcgc cttgctcac catctagctg caccccatg 39

<210> 9
 <211> 7174
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pcDNA3-PCBP1

<400> 9
 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ES 2 387 167 A1

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctcgccatg 900
 gatgccggtg tgactgaaag tggactaaat gtgactctca ccattcggct tcttatgcac 960
 ggaaaggaag taggaagcat cattgggaag aaaggggagt cggttaagag gatccgcgag 1020
 gagagtggcg cgcggatcaa catctcggag gggaattgtc cggagagaat catcactctg 1080
 accggcccca ccaatgcat cttaaggct ttcgctatga tcatcgacia gctggaggaa 1140
 gatatcaaca gtcctatgac caacagtacc gcggccagca ggccccggt caccctgagg 1200
 ctggtggtgc cggccacca gtgcggctcc ctgattggga aaggcgggtg taagatcaaa 1260
 gagatccgcg agagtacggg ggcgcaggtc caggtggcgg gggatatgct gcccaactcc 1320
 accgagcggg ccatcaccat cgctggcgtg ccgcagtctg tcaccgagtg tgtcaagcag 1380
 atttgcctgg tcatgctgga gacgctctcc cagtctccgc aaggagagat catgaccatt 1440
 ccgtaccagc ccatgccggc cagctcccca gtcactctgc cgggcggcca agatcgggtg 1500
 agcgacgctg cgggtacc ccatgccacc catgacctgg agggaccacc tctagatgcc 1560
 tactcgattc aaggacaaca caccatttct ccgctcgatc tggccaagct gaaccaggtg 1620
 gcaagacaac agtctcactt tgccatgatg cacggcggga cggattcgc cggaattgac 1680
 tccagctctc cagaggtgaa aggctattgg gcaagtttg atgcatctac tcaaaccacc 1740
 catgaactca ccattccaaa taacttaatt ggctgcataa tcgggcgcca aggcgccaac 1800
 attaatgaga tccgccagat gtccggggcc cagatcaaaa ttgccaacc agtggaaggc 1860
 tcctctggtg ggcaggttac tactactggc tctgctgcca gtattagtct ggcccagtat 1920
 ctaatcaatg ccaggctttc ctctgagaag ggcattgggt gcagctagat ggtgagcaag 1980
 ggcgaggagc tgttcaccgg ggtgggtgcc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 2040
 ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc 2100

ES 2 387 167 A1

ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgcccct ggccccaccct cgtgaccacc 2160
 ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccgacc acatgaagca gcacgacttc 2220
 ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac 2280
 ggcaactaca agaccgcg ctaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc 2340
 gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac 2400
 aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg 2460
 aacttcaaga tccgccacia catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga cactaccag 2520
 cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc 2580
 cagtcgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc 2640
 gtgaccgccc ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaatg ctttcttgc 2700
 cattgtgtgc tctagagggc cctattctat agtgtcacct aaatgctaga gctcgctgat 2760
 cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt 2820
 ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat 2880
 cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg 2940
 gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg 3000
 aggcgaaaag aaccagctgg ggctctaggg ggtatcccca cgcgccctgt agcggcgcac 3060
 taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgcctag 3120
 cgcccgtcc tttcgctttc ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc tttcccgtc 3180
 aagctctaaa tcggggcatc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc 3240
 ccaaaaaact tgattaggtg gatggttccac gtagtgggccc atcgccctga tagacggttt 3300
 ttcgcccctt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa 3360
 caaactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg gggatttcgg 3420
 cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcaattaa ttctgtggaa 3480
 tgtgtgtcag ttaggggtgt gaaagtcccc aggtccccca ggcaggcaga agtatgcaaa 3540
 gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca 3600
 gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccggcc ctaactccgc 3660
 ccatcccggc ctaactccg cccagttccg cccattctcc gcccctggc tgactaattt 3720
 tttttattta tgagaggcc gaggccgct ctgcctctga gctattccag aagtagtgag 3780
 gaggctttt tggaggccta ggcttttgca aaaagctccc gggagcttgt atatccattt 3840
 tcggatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacia gatggattgc 3900
 acgagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 3960
 caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggccc ccggttcttt 4020
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcccgtat 4080
 cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 4140

ES 2 387 167 A1

gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 4200
 ctcttgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc 4260
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 4320
 tggaagccgg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag 4380
 ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgcgag cgaggatctc gtcgtgacct 4440
 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 4500
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 4560
 ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg 4620
 ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac 4680
 tctggggttc gaaatgaccg accaagcgcg gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc 4740
 caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg ccggctggat 4800
 gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc 4860
 agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt 4920
 ttcactgcat tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatac atgtctgtat 4980
 accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 5040
 ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 5100
 ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 5160
 gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 5220
 tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct ccgctgttcg 5280
 gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg 5340
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 5400
 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 5460
 acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 5520
 tggaagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc 5580
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc 5640
 ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg 5700
 ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc 5760
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 5820
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 5880
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 5940
 caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 6000
 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 6060
 acgttaaggg attttggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 6120
 ttaaaaatga agttttaaata caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 6180

ES 2 387 167 A1

ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 6240
 tgcttgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 6300
 tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca 6360
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 6420
 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 6480
 tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 6540
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg 6600
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat 6660
 ggttatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 6720
 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcgggcgc cgagttgctc 6780
 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 6840
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 6900
 ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 6960
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aaggggaataa gggcgacacg 7020
 gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 7080
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 7140
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc 7174

<210> 10
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador F para la clonación de SP1 en pcDNA3

<400> 10
 cactataggg agaccaagc ccacatgag cgaccaagat cactccat 48

<210> 11
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador R para la clonación de SP1 en pcDNA3

<400> 11
 agtcctcgc cttgctcac cattcagaag ccattgccac t 41

<210> 12
 <211> 8461
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del plásmido pcDNA3-SP1

<400> 12

ES 2 387 167 A1

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gccaccatg 900
 agcgaccaag atcactccat ggatgaaatg acagctgtgg tgaaaattga aaaaggagtt 960
 ggtggcaata atgggggcaa tggtaatggt ggtggtgcct tttcacaggc tcgaagtagc 1020
 agcacaggca gtagcagcag cactggagga ggagggcagg agtcccagcc atccccttg 1080
 gctctgctgg cagcaacttg cagcagaatt gagtcacca atgagaacag caacaactcc 1140
 cagggcccga gtcagtcagg ggaacaggt gagcttgacc tcacagccac acaactttca 1200
 cagggtgcca atggctggca gatcatctct tcctcctctg gggctacccc tacctcaaag 1260
 gaacagagtg gcagcagtac caatggcagc aatggcagtg agtcttcaa gaatcgaca 1320
 gtctctggtg ggcagtatgt tgtggctgcc gctccaact tacagaacca gcaagttctg 1380
 acaggactac ctggagtgat gcctaatt cagtatcaag taatcccaca gttccagacc 1440
 gttgatggc aacagctgca gtttctgcc actggggccc aagtgcagca ggatggttct 1500
 ggtcaaatac agatcatacc aggtgcaaac caacagatta tcacaaatcg aggaagtgga 1560
 ggcaacatca ttgctgctat gccaaacctt ctccagcagg ctgtccccct ccaaggcctg 1620
 gctaataatg tactctcagg acagactcag tatgtgacca atgtaccagt ggcctgaat 1680
 ggaacatca ctttgctacc tgtcaacagc gtttctgcag ctaccttgac tcccagctct 1740
 caggcagtca cgatcagcag ctctgggtcc caggagagt gctcacagcc tgtcacctca 1800
 gggactacca tcagttctgc cagcttgga tcatcacaag ccagttccag ctctttttc 1860
 accaatgcca atagctact aactactact accaccagca acatgggaat tatgaacttt 1920
 actaccagtg gatcatcagg gaccaactct caaggccaga cccccagag ggtcagtggg 1980
 ctacaggggt ctgatgctct gaacatccag caaaaccaga catctggagg ctattgcaa 2040

ES 2 387 167 A1

gcaggccagc aaaaagaagg agagcaaac cagcagacac agcagcaaca aattcttatac 2100
cagcctcagc tagttcaagg gggacaggcc ctccaggccc tccaagcagc accattgtca 2160
gggcagacct ttacaactca agccatctcc caggaaacct tccagaacct ccagcttcag 2220
gctgttccaa actctggtcc catcatcatc cggacaccaa cagtggggcc caatggacag 2280
gtcagttggc agactctaca gctgcagaac ctccaagtcc agaaccaca agcccaaaca 2340
atcaccttag cccaatgca ggggtgttcc ttggggcaga ccagcagcag caacaccact 2400
ctcacacca ttgcctcagc tgcttcatt cctgctggca cagtcactgt gaatgctgct 2460
caactctcct ccatgccagg cctccagacc attaacctca gtgcattggg tacttcagga 2520
atccaggtgc acccaattca aggcctgccg ttggctatag caaatgcccc aggtgatcat 2580
ggagctcagc ttggtctcca tggggctggt ggtgatggaa tacatgatga cacagcaggt 2640
ggagaggaag gagaaaacag cccagatgcc caacccaag ccggctcggag gacccggcgg 2700
gaagcatgca cctgccccta ctgtaaagac agtgaaggaa ggggctcggg ggatcctggc 2760
aaaaagaaac agcatatttg ccacatcaa ggctgtggga aagtgtatgg caagacctct 2820
cacctgcggg cacttgcg ctggcataca ggcgagaggc ctttatgtg tacttggtca 2880
tactgtggga aacgcttcac acgttcggat gagctacaga ggcacaaacg tacacacaca 2940
ggtgagaaga aatttgctg ccctgagtgt cctaagcgt tcatgaggag tgaccacctg 3000
tcaaaacata tcaagacca ccagaataag aagggaggcc caggtgtagc tctgagtgtg 3060
ggcactttgc ccctggacag tggggcaggt tcagaaggca gtggcactgc cactccttca 3120
gcccttatta ccaccaatat ggtagccatg gaggccatct gtccagaggg cattgcccgt 3180
cttgccaaca gtggcatcaa cgtcatgcag gtggcagatc tgcagtccat taatatcagt 3240
ggcaatggct tctgaatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc 3300
ctggtcagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag 3360
ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagtctatct gcaccaccgg caagctgccc 3420
gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtgctt cagccgctac 3480
cccgaccaca tgaagcagca cgacttctc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag 3540
gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc 3600
gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 3660
aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc 3720
gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 3780
agcgtgcagc tcgccacca ctaccagcag aacaccccc a tcggcgacgg ccccgctgctg 3840
ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag 3900
cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac 3960
gagctgtaca agtaatgcct ttcttgccat tgtgtgctct agagggcctt attctatagt 4020
gtcacctaaa tgctagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat 4080

ES 2 387 167 A1

ctgttgtttg cccctcccc gtgccttct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc 4140
 tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg 4200
 ggggtgggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg 4260
 gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc tctaggggggt 4320
 atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg 4380
 tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc 4440
 tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct ttagggttcc 4500
 gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga ttagggatgat ggttcacgta 4560
 gtgggcatc gccctgatag acgggttttc gcccttgac gttggagtcc acgttcctta 4620
 atagtggact cttgttcaa actggaaca cactcaacc tatctcggtc tattcttttg 4680
 atttataagg gattttggg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa 4740
 aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgaa agtccccagg 4800
 ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg 4860
 gaaagtcccc aggctccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag 4920
 caaccatagt cccgcccta actccgccca tcccgccct aactccgcc agttccgcc 4980
 attctccgcc ccatggctga ctaattttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg 5040
 cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa 5100
 agtccccggg agcttgata tccattttc gatctgatca agagacagga tgaggatcgt 5160
 ttcgatgat tgaacaagat ggattgcag caggttctcc ggccgcttg gtggagaggc 5220
 tattcggcta tgactgggca caacagaca tcggctgctc tgatgccgc gtgttccggc 5280
 tgtcagcgca ggggcgccc gttcttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg 5340
 aactgcagga cgaggcagc cggtatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgccag 5400
 ctgtgctcga cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccg 5460
 ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg 5520
 caatgcggcg gctgcatac cttgatccg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac 5580
 atcgcatcga gcgagcacgt actcggatg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg 5640
 acgaagagca tcaggggctc gcgccagcc aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc 5700
 ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 5760
 aaaatggccg cttttctgga ttcactgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc 5820
 aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 5880
 gcttctcgt gctttacgg atcgccgctc ccgattcgca gcgcatgcc ttctatgcc 5940
 ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc 6000
 caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaagg tgggcttcgg 6060
 aatcgttttc cgggacgcc gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 6120

ES 2 387 167 A1

cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat 6180
caciaatttc acaaataaag cttttttttc actgcattct agttgtgggt tgtccaaact 6240
catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc 6300
atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg 6360
agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgcctaataga gtgagctaac tcacattaat 6420
tgcgttgccg tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg 6480
aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct 6540
cactgactcg ctgctgctcg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 6600
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 6660
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 6720
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgagc ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 6780
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 6840
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttctca 6900
atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 6960
gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 7020
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 7080
agcgaggat gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 7140
tagaaggaca gtatttgga tctgcgctct gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt 7200
tgtagctct tgatccggca acaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 7260
gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg 7320
gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 7380
aaggatctc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 7440
atatgagtaa acttggctct acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 7500
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 7560
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgagagacc cacgctcacc 7620
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc 7680
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 7740
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg 7800
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 7860
atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag 7920
taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 7980
catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga 8040
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata ataccgccc 8100
acatagcaga actttaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 8160

ES 2 387 167 A1

aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacct	actcgtgcac	ccaactgatc	8220
ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	8280
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atggtgaata	ctcactctct	tcctttttca	8340
atattattga	agcatttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	8400
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	8460
c						8461



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130222

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20040248131 A1 (RUDEL et al.) 09.12.2004, página 1, párrafos 10-18; página 2, párrafos 33-34; figuras 1-2.	1-22
A	US 5514568 A (STEMMER WPC) 07.05.1996, columna 2, línea 53 – columna 3, línea 44; figuras 1-4.	1-22
A	HEGDE KV. et al. Site-directed in vitro mutagenesis: An improved protocol. Current Science. 10.12.2003. Vol. 85 (11), páginas 1523-1525, todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
13.04.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

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

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20040248131 A1	09.12.2004
D02	US 5514568 A	07.05.1996
D03	HEGDE KV. et al. Current Science. 10.12.2003. Vol. 85 (11), páginas 1523-1525.	10.12.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un método de clonación y/o clonación y mutagénesis dirigida, mediante una PCR clásica con cebadores cuya secuencia, que puede contener mutaciones, híbrida en parte con el inserto y en parte con el vector deseado. A continuación, se realiza una PCR inversa de clonación, que utiliza los amplicones generados anteriormente, de la que se obtienen otros amplicones bicatenarios de largos extremos cohesivos complementarios que circularizan *in situ* en forma de construcciones génicas estables tipo vector, que contienen el ADN clonado en el vector deseado directamente (reivindicaciones 1-15). Se refiere también a un kit y a su uso para llevar a cabo la clonación y/o clonación y mutagénesis dirigida (reivindicaciones 16-22).

El documento D01 divulga un método de clonación y mutagénesis dirigida, empleando un vector circular bicatenario y un par de oligonucleótidos, que hibridan cada uno con una de las cadenas del vector, que contienen en sus correspondientes regiones 5' de dos a cuatro pares de bases complementarias y que al menos uno de ellos contiene, también en la región 5', la secuencia diana mutada. Utilizando dichos oligonucleótidos como cebadores se amplifica la secuencia a mutar obteniendo un ADN de doble cadena que contiene la mutación y que una vez ligados a los extremos del vector origina una construcción de ADN bicatenaria y circular que contiene la mutación. En una variante de este método el vector se corta con endonucleasas de restricción quedando en forma linear con los extremos romos a los que se añade, con ayuda de la polimerasa *Klenow*, uno o dos nucleótidos complementarios a los extremos de la secuencia de oligonucleótidos que se va a insertar, lo que permite que la inserción se realice en cualquier zona (ver página 1, párrafos 10-18; página 2, párrafos 33-34; figuras 1-2).

El documento D02 divulga un método de mutagénesis dirigida mediante PCR inversa en una doble cadena de ADN circular, empleando un par de oligonucleótidos cebadores que contienen, en dirección 5'a 3', enzimas de restricción de tipo IIS, que reconocen los lugares de unión dirigiendo el cambio con la mutación deseada para ser incorporado a la doble cadena de ADN circular. La secuencia a clonar se amplifica por PCR y con ayuda de las correspondientes enzimas se introduce en la doble cadena circular (ver columna 2, línea 53 - columna 3, línea 44; figuras 1-4).

El documento D03 divulga un método de mutagénesis dirigida que incluye dos mutaciones, permitiendo mutar una secuencia ya clonada en un vector mediante PCR clásica seguida de una PCR inversa (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

La presente solicitud divulga un método de clonación y/o clonación y mutagénesis dirigida mediante una PCR clásica, con cebadores que pueden contener mutaciones y que hibridan en parte con el inserto y en parte con el vector deseado, y realizando posteriormente una PCR inversa de clonación.

1.1. REIVINDICACIONES 1-22

La clonación de fragmentos de ADN y la mutagénesis dirigida son conocidas en el estado de la técnica. Los documentos D01-D03 se refieren a métodos *in vitro* de clonación y mutación mediante amplificación de la secuencia mutada por técnicas de PCR. Sin embargo, el método reivindicado en la presente invención, difiere de los anteriores en el uso de una segunda PCR, de clonación inversa, que permite la inserción cualquier segmento de ADN, incluso genes completos, además de elegir la orientación del inserto y no requiere el estudio de dianas de corte específicas para enzimas de restricción.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D03, las reivindicaciones 1-22 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).